

Université de Montréal

Vulnérabilité cardiaque au stress au cours du remodelage ventriculaire pathologique:  
Rôle de la mitochondrie et du pore de perméabilité transitionnelle (PTP)

par

Alexis Ascah

Département de Kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de  
l'obtention du grade de Ph.D. en Sciences de l'activité physique

Décembre 2010

© Alexis Ascah, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Vulnérabilité cardiaque au stress au cours du remodelage ventriculaire pathologique:  
Rôle de la mitochondrie et du pore de perméabilité transitionnelle (PTP)

présentée par

Alexis Ascah

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Marc Lavoie  
président-rapporteur

Yan Burelle  
directeur de recherche

Raynald Bergeron  
membre du jury

Richard Debigaré  
examineur externe

Hélène Girouard  
représentant du doyen de la FES

## RÉSUMÉ

L'objectif central de cette thèse de Doctorat était d'investiguer les dysfonctions mitochondriales qui surviennent précocement au cours de la phase compensée du remodelage ventriculaire pathologique et qui pourraient jouer un rôle causal dans la progression vers l'insuffisance cardiaque.

Nos travaux antérieurs, réalisés à l'aide d'un modèle de surcharge volumique chronique induite par une fistule aorto-cavale (ACF) chez le Rat WKHA, ont montré qu'au cours du remodelage ventriculaire, les mitochondries développaient une vulnérabilité à l'ouverture du pore de perméabilité transitionnelle (PTP : un élément clé de la signalisation de la mort cellulaire) [1]. Ceci était observable au stade compensé du remodelage en absence des dysfonctions mitochondriales majeures typiquement observées dans le cœur insuffisant. Ces résultats nous ont amenés à suggérer que la vulnérabilité à l'ouverture du PTP pourrait constituer un mécanisme précoce favorisant la progression de la cardiopathie. Dans l'étude 1 de cette thèse, nous avons tenté de tester cette hypothèse en induisant une ACF chez deux souches de rats affichant de très nettes différences au niveau de la propension à développer l'insuffisance cardiaque : les souches WKHA et Sprague Dawley (SD). Nos études *in vitro* sur organelles isolées et *in situ* sur l'organe entier ont permis de confirmer que, dans le cœur ACF, les mitochondries développent une vulnérabilité à l'ouverture du PTP et à l'activation de la voie mitochondriale de la mort cellulaire lorsqu'exposées à des stress pertinents à la pathologie (surcharge calcique, ischémie-reperfusion [I-R]). Cependant, bien que comparativement aux animaux WKHA, les animaux SD démontraient un remodelage ventriculaire plus rapide et prononcé et une progression précoce vers l'insuffisance cardiaque, aucune différence n'était observable entre les deux groupes au niveau des dysfonctions mitochondriales, suggérant qu'elles ne sont pas à l'origine de la progression

plus rapide de la pathologie chez la souche SD, à tout le moins en réponse à la surcharge volumique.

Nous avons par la suite déterminé, à l'aide des mêmes approches expérimentales, si cette vulnérabilité mitochondriale était observable dans une cardiopathie d'étiologie différente, plus spécifiquement celle qui est associée à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), une maladie génétique causée par une mutation de la protéine dystrophine. Nos études menées (études 2-4) sur de jeunes souris *mdx* (le modèle murin de la DMD) exemptes de tout signe clinique de cardiopathie n'ont révélé aucune différence au niveau des fonctions mitochondriales de base. Cependant, tout comme dans le modèle d'ACF, les mitochondries dans le cœur de souris *mdx* étaient significativement plus vulnérables à l'ouverture du PTP lorsque soumises à une I-R (étude 2). Par ailleurs, nous avons démontré que l'administration aiguë de sildénafil aux souris *mdx* induisait une abolition de l'ouverture du PTP et de ses conséquences signalétiques, une diminution marquée du dommage tissulaire et une meilleure récupération fonctionnelle à la suite de l'I-R (étude 3). Nous avons ensuite testé chez la souris *mdx* l'administration aiguë de SS31, un peptide anti-oxydant ciblé aux mitochondries, cependant aucun effet protecteur n'a été observé, suggérant que le tamponnement des radicaux libres est d'une utilité limitée si les perturbations de l'homéostasie calcique typiques à cette pathologie ne sont pas traitées simultanément (étude 4).

Globalement, les travaux effectués au cours de cette thèse démontrent que la vulnérabilité à l'ouverture du PTP constitue une dysfonction précoce et commune qui survient au cours de remodelages ventriculaires pathologiques d'étiologies différentes. Par ailleurs, ces travaux suggèrent des stratégies d'intervention pharmacologiques ciblant ce processus, dont l'efficacité pour la prévention de l'insuffisance cardiaque demande à être établie.

#### **MOTS CLÉS:**

Cœur, mitochondries, pore de perméabilité transitionnelle, ischémie-réperfusion et Dystrophie musculaire de Duchenne

## SUMMARY

The central objective of this doctoral thesis was to investigate the mitochondrial dysfunction that occurs early during the compensated phase of pathological ventricular remodeling and which may play a causal role in the progression to heart failure.

Our previous work using a model of chronic volume overload induced by aorto-caval fistula (ACF) in rats WKHA showed that during the ventricular remodeling, mitochondria developed a vulnerability to permeability transition pore opening (PTP: a key component of cell death signaling) [1]. This was observed at the stage of compensated remodeling in the absence of major mitochondrial dysfunction typically observed in the failing heart. These results led us to suggest that the vulnerability to PTP opening could be a mechanism facilitating the progression of the cardiomyopathy. In our first study of this thesis we have attempted to test this hypothesis by inducing ACF in two strains of rats displaying sharp differences in the propensity to develop heart failure: WKHA strains and Sprague Dawley (SD). Our studies *in vitro* on isolated organelles and *in situ* on the whole organ have confirmed that, in the ACF heart, mitochondria develop a vulnerability to PTP opening and activation of mitochondrial cell death when exposed to stresses relevant to the pathology (calcium overload, ischemia-reperfusion [I-R]). However, SD animals compared to WKHA showed a more rapid and pronounced ventricular remodeling and early progression to heart failure, no difference was found between the two groups in terms of mitochondrial dysfunction, suggesting that this is not behind the more rapid progression of the disease in the SD strain, at least in response to volume overload.

We subsequently determined, using the same experimental approaches, if this vulnerability was observed in mitochondria of heart disease from other etiology more

specifically that associated with Duchenne muscular dystrophy (DMD), a genetic disease caused by a mutation of the protein dystrophin. Our studies (studies 2-4) on young *mdx* mice (the mouse model of DMD) free of clinical signs of heart disease showed no difference in basal mitochondrial functions. However, as in the model of ACF, the mitochondria of *mdx* mice heart were significantly more vulnerable to PTP opening when subjected to I-R (study 2). Furthermore, we demonstrated that acute administration of sildenafil to *mdx* mice abolished the PTP opening and its signaling consequences, markedly reduced of tissue damage and improved functional recovery following I-R (Study 3). We then tested in *mdx* mice acute administration of SS31, an antioxidant peptide that targets and accumulates in mitochondria. However, no protective effect was observed, suggesting that the buffering of free radicals have a limited utility if the typical perturbations of the calcium homeostasis in this disease are not treated simultaneously (Study 4).

Overall, the work done during this thesis show that the vulnerability to PTP opening is a common and early dysfunction that occurs during pathological ventricular remodeling of different etiologies. Moreover, these studies suggest pharmacological intervention strategies targeting this process, whose effectiveness in preventing heart failure needs to be established.

**KEY WORDS:**

Heart, mitochondria, permeability transition pore, ischemia-reperfusion and Duchenne muscular dystrophy.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>I</b>
<b>MOTS CLÉS: .....</b>	<b>II</b>
<b>KEY WORDS:.....</b>	<b>IV</b>
<b>FIGURES .....</b>	<b>VII</b>
<b>TABLEAUX.....</b>	<b>X</b>
<b>ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Présentation du travail expérimental .....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Étude 1 : dysfonctions mitochondriales précoces au cours du remodelage ventriculaire hypertrophique. ....	16
1.1.2 Études 2, 3 et 4 : vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP dans la cardiopathie associée à la dystrophie musculaire de Duchenne. ....	18
<b>1.2 Présentation de la revue de littérature .....</b>	<b>20</b>
<b>2 RÔLE DES MITOCHONDRIES DANS LA VIE ET LA MORT CELLULAIRE.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Production d'ATP et mécanisme de l'oxydation phosphorylante .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 La production d'espèces réactives de l'oxygène .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Mort cellulaire : apoptose versus nécrose .....</b>	<b>27</b>
2.3.1 La voie extrinsèque .....	33
2.3.2 La voie intrinsèque .....	35
<b>2.4 Mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales .....</b>	<b>37</b>
2.4.1 La famille des Bcl-2 .....	37
2.4.2 Le PTP .....	38
2.4.2.1 Régulation du PTP.....	39
2.4.2.2 Structure du PTP .....	42
2.4.2.3 Rôle du PTP dans l'ischémie-réperfusion.....	45
<b>3 RÔLE DES MITOCHONDRIES DANS LE REMODELLAGE HYPERTROPHIQUE DU CŒUR ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Introduction .....</b>	<b>52</b>

<b>3.2</b>	<b>Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries dans le cœur insuffisant. ....</b>	<b>54</b>
<b>3.3</b>	<b>Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries en phase d'hypertrophie compensée.....</b>	<b>62</b>
<b>3.4</b>	<b>Activation des mécanismes mitochondriaux de mort cellulaire dans le cœur insuffisant. ....</b>	<b>68</b>
<b>3.5</b>	<b>La vulnérabilité au stress : un contributeur potentiel à la transition vers l'insuffisance cardiaque. ....</b>	<b>72</b>
<b>4</b>	<b>LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE .....</b>	<b>86</b>
<b>4.1</b>	<b>Cardiomyopathie reliée à la dystrophine .....</b>	<b>87</b>
<b>4.2</b>	<b>Vulnérabilité du tissu musculaire au stress .....</b>	<b>88</b>
<b>4.3</b>	<b>Mécanismes impliqués dans la vulnérabilité des cardiomyocytes au stress et relation avec les mitochondries .....</b>	<b>91</b>
4.3.1	Surcharge calcique .....	92
4.3.2	Les ROS .....	100
4.3.3	Déficit de signalisation par l'oxyde nitrique .....	104
4.3.4	Anomalies au niveau de l'oxydation phosphorylante : .....	114
<b>5</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>117</b>
<b>5.1</b>	<b>Article 1 .....</b>	<b>117</b>
<b>5.2</b>	<b>Article 2 .....</b>	<b>157</b>
<b>5.3</b>	<b>Article 3 .....</b>	<b>203</b>
<b>5.4</b>	<b>Article 4 .....</b>	<b>239</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>267</b>
<b>6.1</b>	<b>Vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP : un phénomène précoce impliqué dans la progression du remodelage ventriculaire pathologique? .....</b>	<b>267</b>
<b>6.2</b>	<b>Mécanismes impliqués dans la vulnérabilité à l'ouverture du PTP dans la cardiopathie dystrophique.....</b>	<b>271</b>
6.2.1	Entrée excessive de calcium dans les cardiomyocytes.....	271
6.2.2	Vélocité de prise calcique mitochondriale .....	272
6.2.3	Stress oxydant mitochondrial .....	273
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>276</b>



## FIGURES

Figure 1: La chaîne respiratoire et ses inhibiteurs.

Figure 2: Comparaison des étapes clés de l'apoptose et de la nécrose.

Figure 3: La cascade des caspases.

Figure 4: Les voies extrinsèques de la mort cellulaire.

Figure 5: Représentation schématique des voies de mort cellulaire intrinsèque et extrinsèque qui régulent l'apoptose chez le mammifère.

Figure 6: Facteurs contribuant à l'ouverture du PTP à la suite de l'ischémie-réperfusion.

Figure 7: Effet de la CsA sur la fonction contractile du cœur soumis à une ischémie-réperfusion.

Figure 8: Effet de la CsA sur le contenu mitochondrial en cytochrome c après une période d'ischémie.

Figure 8a: Effet de la CsA et de la Sanglifehrin-A, un analogue non immunosuppresseur sur la fonction contractile et le dommage tissulaire, à la suite d'une période d'ischémie-réperfusion.

Figure 9 : Morphologie des cardiomyocytes et des mitochondries dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par le  $\text{TNF}\alpha$ .

Figure 10: Production de radicaux libres par des particules mitochondriales isolées à partir de cœurs normaux et insuffisants.

Figure 11: Fonction respiratoire mesurée sur des mitochondries isolées à partir de cœurs en phase d'hypertrophie compensée et d'insuffisance.

Figure 12: Propriétés respiratoires de mitochondries isolées à partir de cœurs normaux ou en stade d'hypertrophie compensée à la suite d'une constriction de l'aorte abdominale.

Figure 13: Effet de l'hypertrophie cardiaque sur la respiration mitochondriale lors d'une inhibition du complexe IV avec  $\text{NO}^\bullet$ .

Figure 14: Effet de l'hypertrophie cardiaque sur l'expression de la NO-synthase.

Figure 15: Ouverture du PTP représentée en unité DOG dans les mitochondries cardiaques isolées de rats de 12 sem (A) et 18 sem (B) après une ligature d'une artère coronaire (CAL) ou non (Sham).

Figure 16: Effet du remodelage ventriculaire hypertrophique sur la vulnérabilité des cardiomyocytes au stress *in vitro*.

Figure 17: Effet de la surcharge volumique sur la fonction basale de mitochondries cardiaques.

Figure 18: Effet de la surcharge volumique sur la dysfonction respiratoire induite par une anoxie-réoxygénation *in vitro*.

Figure 19: Effet de la surcharge volumique sur la vulnérabilité à l'ouverture du PTP induite par surcharge calcique.

Figure 20: Réponse du myocarde à une ischémie-réperfusion *ex vivo* chez des animaux Sham et ACF.

Figure 21: Relâche de LDH, séquestration mitochondriale du [<sup>3</sup>H]-DOG et mesure de la fonction respiratoire sur mitochondries isolées post-réperfusion dans les groupes Sham et ACF.

Figure 22: Relâche de cytochrome c et de Smac/Diablo dans le cytosol lors d'une ischémie-réperfusion sur des cœurs d'animaux Sham (n=4) et ACF (n=4).

Figure 23: Effet d'un stress mécanique sur le dommage cardiaque et la survie chez la souris *mdx*.

Figure 24: Prise excessive de calcium mitochondrial dans des cardiomyocytes de cœurs *mdx* soumis à un stress mécanique *in vitro*.

Figure 25: Perte du potentiel membranaire mitochondrial dans les cardiomyocytes de cœurs *mdx* soumis à un stress mécanique *in vitro*.

Figure 26: Prise excessive de calcium mitochondrial dans des fibres musculaires *mdx* soumises à un stress mécanique *in vitro*.

Figure 27: La production mitochondriale de superoxyde dans des fibres musculaires *mdx* soumises à un stress mécanique *in vitro*

Figure 28: Intermédiaire du cycle de Krebs du myocarde *in vivo* et après un protocole de perfusion cardiaque en mode travaillant chez des souris contrôles C57BL/10 et *mdx*.

Figure 29: Fréquence cardiaque et quantification des dommages au sarcolemme des cardiomyocytes *in vivo*, à la suite d'une forte augmentation du stress mécanique cardiaque par la perfusion d'isoprotérénol chez les souris *mdx* et *mdx* / GC<sup>+/0</sup>.

Figure 30: Paramètres fonctionnelles et physiologiques lors d'un protocole de perfusion cardiaque en mode travaillant sur des souris *mdx* et *mdx*/GC<sup>+/0</sup> de 12 et 20 semaines.

Figure 31: Fréquence cardiaque et quantification des dommages au sarcolemme des cardiomyocytes *in vivo*, à la suite d'une forte augmentation du stress mécanique cardiaque par la perfusion d'isoprotérénol chez les souris *mdx* traitées au sildénafil ou avec le placebo.

Figure 32: Effet du Sildénafil et/ou du 1400W.

Figure 33: Intermédiaire du cycle de Krebs après un protocole de perfusion cardiaque en mode travaillant chez des souris *mdx* et *mdx* / GC<sup>+/0</sup>.

Figure 34 : L'ouverture du pore de perméabilité transitionnelle (mPTP) chez les sous-populations de mitochondries.

**TABLEAUX**

Tableau I: Régulation de l'ouverture du PTP par différents effecteurs physiologiques.

Tableau II: Activité des complexes de la chaîne respiratoire chez des patients humains atteints de cardiopathies dilatées ou ischémiques.

Tableau III: Respiration de mitochondries isolées de coeurs contrôles (SHAM) ou 18 sem post-ligature de l'artère coronaire (CAL).

Tableau IV : Activité des enzymes mitochondriales chez les rats Sham et ACF.

## ABRÉVIATIONS

ACF= fistule aorto-cavale  
 ADN = acide désoxyribonucléique  
 ADP = adénine di-phosphate  
 AIF = facteur d'induction de l'apoptose  
 AMP = adénine mono-phosphate  
 ANT = translocateur des nucléotides adénylés  
 APAF = apoptosis protein associated factor  
 A-R= anoxie-réoxygénation  
 ARNm= acide ribonucléique messagé  
 ATP = adénine tri-phosphate  
 Bad = Bcl-X<sub>L</sub>/Bcl-2 associated death promoter homolog  
 Bak = Bcl-2 antagonist killer  
 BAND= constriction de l'aorte abdominale  
 Bax = Bcl-2 associated X protein  
 Bcl-2 = B-cell lymphoma 2  
 Bcl<sub>XL</sub> = longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein from avian lymphocyte development  
 BH3= Bcl-2 homology domain 3  
 Bid = BH3 interacting death domain agonist  
 Bim = Bcl-2 interacting mediator of cell death  
 BMD= dystrophie musculaire de Becker  
 Bmf = Bcl-2 modifying factor  
 BNip3 ou NIX = Bcl-2 adenovirus e1b 19kd interacting protein 3  
 BPM= fréquence cardiaque  
 BSA = albumine de sérum bovin  
 Ca<sup>2+</sup> = ion calcique  
 Caspase = cysteinyl-aspartate-cleaving proteases  
 CoQ = coenzyme Q  
 CRC= capacité de rétention calcique  
 CS = citrate synthase  
 CsA = cyclosporine A  
 Cyp-D = cyclophiline-D  
 Da = dalton  
 DCFH= dichlorofluoresceine  
 DHE= dihydroéthidine  
 DMD= dystrophie musculaire de Duchenne  
 DOG = déoxyglucose  
 ECG= électrocardiogramme  
 EDP = pression diastolique finale  
 EGTA = éthylène glycol bis(2-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-acide tétraacétique  
 EMD = 2-méthyl-4,5-di-(méthylsulfonyl)-benzoyl)-guanidine  
 EndoG = endonucléase G  
 ERK = kinase régulée extracellulaire  
 FADH<sub>2</sub> = flavine-adénine dinucléotide (réduit)  
 GC = guanylyl cyclase  
 GMPc= guanosine monophosphate cyclique  
 IFM= mitochondrie interfibrillaire  
 IP<sub>3</sub>= inositol triphosphate  
 I-R = ischémie-réperfusion

LDH = lactate déshydrogénase  
 L-NAME= nitro-L-arginine méthyl ester  
 LVDP = pression développée par le ventricule gauche  
 LVEDP = la pression dans le ventricule gauche à la fin de la diastole  
 MitoSOX= indicateur de surperoxyde dans les mitochondries  
 NAC= N-acétylcystéine  
 NADH = nicotinamide-adénine dinucléotide (réduit)  
 NADPH = nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (réduit)  
 NCX= l'échangeur sodium-calcium  
 NIX = NFκB induceur kinase  
 NO= oxyde nitrique  
 NOS = oxyde nitrique synthase  
 OMI ou HtrA2 = high temperature requirement protein A2  
 PDE = phosphodiesterase  
 P<sub>i</sub> = phosphate inorganique  
 PKB ou Akt = protéine kinase B  
 PKC = protéine kinase C  
 PKG = protéine kinase G  
 PLN= phospholamban  
 PTP = pore de perméabilité transitionnelle  
 PUMA = p53-upregulated modulator of apoptosis  
 RCR = ratio de contrôle respiratoire  
 ROS = spécimens réactifs dérivés de l'oxygène  
 RPP= produit de la pression développée et du poul  
 RYRs= récepteurs à la ryanodine  
 SACs= canaux calciques voltage indépendants sensibles à l'étirement  
 SD = Sprague-Dawley  
 SEM= écart type de la moyenne  
 SERCA= Ca<sup>2+</sup> ATPase du réticulum sarcoplasmique  
 SfA = sangliféhrine A  
 sGC= l'isoforme soluble de la guanylatse cyclase  
 SHAM= chirurgie omettant la composante thérapeutique  
 Smac/DIABLO = second mitochondria-derived activator of caspases-direct inhibitor of apoptosis binding protein with low P<sub>i</sub>  
 SOC= canaux calciques réserve dépendants  
 SOD= superoxyde dismutase  
 SSM= mitochondrie sous-sarcolemmale  
 TEMPO= 2,2,6,6-Tetramethylpipéridine-1-oxyl  
 TIRON= acide 4,5-dihydroxy-1,3-benzène disulfonique  
 TMPD= N,N,N',N'-tetramethyle-p-phénylènediamine  
 TMRE= tetramethylrhodamine d'ester  
 TNFα = facteur de nécrose tumoral α  
 TRPCs= famille des récepteurs transitoires au potentiel canonique  
 TUNEL = Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling  
 VDAC = canal anionique voltage dépendant  
 VOL = surcharge volumique  
 WKHA = Wistar-Kyoto hyperactif  
 XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis protein  
 XO= xanthine oxydase

## REMERCIEMENTS

Je ne peux commencer cette thèse sans remercier Yan Burelle pour ces six années exceptionnelles que j'ai passées en laboratoire avec lui. Son grand esprit scientifique ainsi que ses connaissances méthodologiques continuent à m'impressionner tous les jours.

Le travail expérimental de cette thèse a été rendu possible grâce aux personnes qui ont passé au laboratoire Burelle : Marichoux, Jimmy, Fred, Rich. J'ai aussi eu la chance de travailler avec deux techniciennes hors pair en la personne de Céline Bourcier et de Sonia Deschenne. On m'a dit dernièrement qu'il y avait deux types de personnes, celles qui font le travail et celles qui en prennent le crédit et qu'il y avait beaucoup plus de satisfaction à faire partie du premier groupe ainsi que moins de compétition. Toutes les personnes nommées font partie du premier groupe!

Parlant de travail, je ne peux que me mettre à genoux et remercier mes parents pour le travail colossal qu'ils ont fait pour faire un homme de moi. Je vous serai éternellement reconnaissant. De plus vous m'avez donné la chance d'avoir deux sœurs magnifiques; Isabelle et Jeanne-Laurence que j'embrasse fort et que j'aime de tout mon cœur.

Derrière chaque grand homme se cache une femme extraordinaire et c'est pourquoi j'aimerais rendre hommage à mon mulet qui est ma conscience, ma raison de vivre, mon amour et qui sera une mère exceptionnelle. C'est pourquoi; Valérie Tcholkayan, voudrais-tu me faire l'honneur de devenir ma femme et du même coup faire de moi l'homme le plus heureux sur Terre.

# **Chapitre 1- Revue de littérature**



## **1 INTRODUCTION**

### **1.1 Présentation du travail expérimental**

Les mitochondries sont des organelles vitales de la cellule qui accomplissent une variété de fonctions fondamentales, dont la plus connue est la synthèse de l'ATP par l'oxydation phosphorylante via la chaîne respiratoire. Elles sont également impliquées dans plusieurs autres voies métaboliques, comme la synthèse des acides aminés, des vitamines, et des acides gras [2, 3], et participent de façon importante à l'homéostasie et la signalisation calcique. Les mitochondries sont également le siège d'une production permanente de radicaux libres (ROS) qui peuvent jouer un rôle physiologique de signalisation ou êtres dommageables pour la cellule, selon la quantité produite. Finalement, au cours des quinze à vingt dernières années, plusieurs études ont permis de démontrer que des mécanismes complexes et régulés de perméabilisation des membranes mitochondriales jouaient un rôle important dans le déclenchement de la mort cellulaire, tant nécrotique qu'apoptotique, dans plusieurs organes et types cellulaires.

Dans le cœur, plusieurs études chez l'Homme et l'animal ont démontré la présence de multiples anomalies mitochondriales dans l'insuffisance cardiaque induite par des pathologies acquises. Par exemple, l'insuffisance cardiaque causée par la surcharge hémodynamique chronique ou le remodelage post-infarctus est associée à des atteintes structurales, à des dysfonctions incluant une diminution de la capacité oxydative, une augmentation de la production de ROS par la chaîne respiratoire, et à

la présence de mutations ou de délétions de l'ADN mitochondrial [4]. Plusieurs études ont également démontré la présence de signes de mort cellulaire ainsi qu'une relâche accrue de facteurs pro-apoptotiques par les mitochondries. Cependant, la grande majorité des études disponibles ont été effectuées sur des cœurs ayant atteint un stade avancé d'insuffisance, ce qui engendre deux conséquences sur notre compréhension actuelle de la pathogénèse. D'une part, il demeure incertain si les dysfonctions mitochondriales sont des causes du développement de l'insuffisance cardiaque ou des conséquences tardives de cet état. D'autre part, il existe peu d'informations au sujet des dysfonctions mitochondriales survenant au cours de la phase précoce de remodelage ventriculaire hypertrophique qui pourrait promouvoir l'accumulation de dommages mitochondriaux et l'activation de la voie mitochondriale de la mort cellulaire lorsque le cœur atteint l'insuffisance.

### **1.1.1 Étude 1 : dysfonctions mitochondriales précoces au cours du remodelage ventriculaire hypertrophique.**

Pour investiguer ces questions, notre laboratoire, en collaboration avec celui du Dr. Deschepper, a réalisé une première étude en 2006 [1] faisant usage d'un modèle bien défini de surcharge volumique (VOL) induit par une fistule aorto-cavale (ACF) chez des rats WKHA (une souche consanguine affichant une prédisposition à l'hypertrophie). Les résultats de cette étude ont démontré que, dans les cœurs d'animaux ACF, les mitochondries développaient une vulnérabilité à l'ouverture du pore de perméabilité transitionnelle (PTP : un événement clé dans l'activation de la nécrose et de l'apoptose,) lorsque soumises à un stress aigu, soit *in vitro* sur

organelles isolées, ou dans l'organe entier perfusé *ex vivo*. Fait important, ce phénomène était observable en l'absence de dysfonctions systoliques et de déficits de la fonction respiratoire des mitochondries. *Ces résultats nous ont donc amenés à suggérer que la vulnérabilité mitochondriale au stress, particulièrement à l'ouverture du PTP, constituerait une dysfonction précoce qui pourrait prédisposer aux anomalies mitochondriales multiples et à l'activation des processus de mort cellulaire, typiquement observés lorsque le cœur progresse vers l'insuffisance.*

Dans la première étude de cette thèse publiée dans *Molecular and Cellular Biochemistry*, nous avons cherché à confirmer cette hypothèse plus fermement, en comparant deux souches de rats affichant des prédispositions génétiques très différentes au développement de l'insuffisance cardiaque en réponse à l'ACF : 1) la souche WKHA qui est résistante et n'affiche qu'une mortalité de 18% avant 39 semaines post-chirurgie et 2) la souche Sprague-Dawley (SD) qui est susceptible et affiche une mortalité de 64% sur la même période. Nous avons spécifiquement déterminé **a)** si la vulnérabilité mitochondriale au stress se développait plus tôt chez les animaux progressant plus rapidement vers l'insuffisance (*i.e.* chez les rats SD vs les WKHA) et **b)** si la vulnérabilité mitochondriale observée dans la phase précoce du remodelage progressait vers les dysfonctions mitochondriales plus sévères avec l'avancement de la pathologie. Par ailleurs, comme les facteurs expliquant cette différence de susceptibilité à l'insuffisance cardiaque entre les deux souches de rats étaient inconnus, plusieurs variables morphologiques, hémodynamiques et

biochimiques ont également été mesurées à différents temps après l'induction de l'ACF de manière à obtenir un portrait plus englobant.

### **1.1.2 Études 2, 3 et 4 : vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP dans la cardiopathie associée à la dystrophie musculaire de Duchenne.**

Bien que les cardiopathies hypertrophiques acquises soient les plus prévalantes chez l'Homme et par conséquent les plus étudiées, plusieurs maladies génétiques induisent des cardiopathies progressives qui peuvent mener à l'insuffisance cardiaque [5]. C'est notamment le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), une pathologie causée par la mutation de la protéine cytosquelettique dystrophine dans le muscle strié, induisant une susceptibilité précoce des myocytes au dommage induit par le stress mécanique [6-10]. Bien que l'absence de dystrophine soit la cause primaire de la pathologie, les travaux effectués au cours de la dernière décennie ont démontré que l'instabilité et la rupture de la membrane des cardiomyocytes causées par l'absence de dystrophine fonctionnelle ne pouvaient entièrement expliquer le développement de la cardiopathie. En outre, des travaux récents, réalisés dans le laboratoire du Dr. Des Rosiers de l'Institut de Cardiologie de Montréal, ont démontré la présence d'anomalies métaboliques mitochondriales dans le cœur isolé perfusé *ex vivo* chez la souris *mdx*, (le modèle murin de la DMD), notamment la perte d'intermédiaire du cycle de Krebs, et la présence de stress oxydant [7]. Fait notable, ces anomalies étaient décelables à un jeune âge (12 semaines), en absence de signes cliniques de cardiopathies [7], suggérant que ces

dernières pourraient contribuer de façon précoce à la susceptibilité du myocarde au stress et ultimement au développement de la pathologie.

Dans la deuxième étude de cette thèse publiée dans le *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, nous avons poursuivi cette investigation. Plus spécifiquement, nous avons réalisé une analyse de la littérature actuelle suggérant l'implication précoce des mitochondries dans la cardiopathie dystrophique et intégré ces données dans notre hypothèse générale sur le rôle de la vulnérabilité mitochondriale au stress dans la progression vers l'insuffisance cardiaque. Nous avons également développé une approche expérimentale qui nous a permis d'établir directement la présence d'une vulnérabilité mitochondriale précoce à l'ouverture du PTP dans le cœur de souris *mdx* soumis à une ischémie-reperfusion *ex vivo*. Finalement, à la lumière d'évidences expérimentales disponibles nous avons discuté du rôle potentiel de stratégies pharmacologiques visant la protection mitochondriale dans le traitement de la cardiopathie dystrophique.

Dans la troisième étude de cette thèse publiée dans l'*American Journal of Physiology*, nous avons poursuivi cette voie en investiguant plus spécifiquement l'effet protecteur du citrate de sildénafil contre le dommage induit par le stress chez la souris *mdx*. En effet, bien que cet inhibiteur de la phosphodiesterase 5 (PDE-5) soit principalement connu pour ses effets vasculaires, nous avons plusieurs raisons de croire que son effet protecteur pourrait impliquer la diminution des dysfonctions mitochondriales dans les cardiomyocytes. Cependant, ceci n'avait jamais été vérifié

expérimentalement. Dans cette étude nous avons donc testé l'effet d'une administration aiguë de sildénafil *in vivo* sur l'ouverture du PTP, la signalisation de la mort cellulaire et le dommage tissulaire, dans le cœur de souris *mdx* soumis à une ischémie-reperfusion *ex vivo*. Nous avons également investigué certains facteurs potentiellement responsables de la vulnérabilité à l'ouverture du PTP en réponse au stress dans le cœur *mdx* et vérifié l'impact du sildénafil sur ces facteurs.

Finalement, la quatrième étude de cette thèse, qui sera soumise pour publication prochainement, fait suite à nos résultats antérieurs (étude 3 et [7]) montrant une diminution de l'activité de l'enzyme aconitase dans le cœur de jeunes souris *mdx*. Cette enzyme du cycle de Krebs est particulièrement sensible à l'inactivation par le stress oxydant, suggérant qu'une production excessive de ROS par les mitochondries pourrait être une cause de l'ouverture excessive du PTP et du dommage cardiaque lorsque le cœur dystrophique est soumis à un stress. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons testé l'effet d'un peptide synthétique (le SS-31), appartenant à une nouvelle classe d'antioxydants ciblés aux mitochondries, contre le dommage tissulaire et l'ouverture du PTP dans notre modèle de cœur perfusé *ex vivo*.

## **1.2 Présentation de la revue de littérature**

La revue de littérature présentée dans cette thèse est articulée en trois parties. Dans la première, une revue générale sur la mitochondrie et son rôle dans la signalisation de la mort cellulaire est présentée. Compte tenu de la nature du travail

expérimental effectué, une attention particulière est portée au phénomène de perméabilité transitionnelle mitochondriale ainsi qu'à ses conséquences.

La deuxième partie de la revue de littérature est quant à elle consacrée à l'hypertrophie cardiaque pathologique et plus particulièrement aux modifications de la fonction mitochondriale qui ont été observées à différents stades de la progression de la pathologie, notamment au niveau de la morphologie, de la fonction respiratoire, de la production de ROS, de la signalisation de l'apoptose et de la vulnérabilité de ces dernières au stress.

Finalement, la troisième partie de la revue de littérature est consacrée à la cardiopathie dans la dystrophie musculaire de Duchenne. Cette partie présente de manière plus substantielle les concepts présentés dans la revue de littérature de notre deuxième étude publiée dans le *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.

## **2 RÔLE DES MITOCHONDRIES DANS LA VIE ET LA MORT CELLULAIRE**

### **2.1 Production d'ATP et mécanisme de l'oxydation phosphorylante**

La mitochondrie est une organelle à double membrane dont le rôle le plus connu est la production d'ATP. Les cardiomyocytes possèdent la plus grande densité mitochondriale de toutes les cellules chez les mammifères. Elles représentent entre 30 et 40% du volume des cardiomyocytes et sont responsables de plus de 90% de la production d'ATP de ces derniers [11, 12]. La chaîne respiratoire est composée de

quatre complexes enzymatiques situés dans la membrane interne et chacun de ces complexes est constitué de plusieurs sous-unités protéiques (le nombre varie selon le complexe).

- **complexe I** : NADH-ubiquinone oxydoréductase (46 sous-unités),
- **complexe II** : succinate-ubiquinone oxydoréductase (4 sous-unités),
- **complexe III** : ubiquinol cytochrome c oxydoréductase (11 sous-unités)
- **complexe IV** : cytochrome c oxydase (13 sous-unités). Il contient le site de liaison de l'oxygène.

Cet ensemble de complexes est aussi désigné sous le nom de chaîne de transfert d'électrons.

Les électrons sont transférés séquentiellement à chacun des complexes qui passent par un état réduit lorsqu'ils acceptent un électron puis à un état oxydé lorsque les électrons sont transférés au complexe suivant. Cette chaîne de transport contient également le coenzyme Q (CoQ), une quinone lipophile qui diffuse dans la membrane interne et assure le transfert des électrons des complexes I et II vers le complexe III. Le second transporteur mobile de la chaîne respiratoire est le cytochrome c qui est fixé aux cardiolipines à la surface de la membrane interne, et qui établit une navette d'électrons entre les complexes III et IV. L'apport en électrons à la chaîne respiratoire est assuré par l'oxydation du NADH et du FADH<sub>2</sub> au niveau des complexes I et II respectivement, alors que l'oxygène agit comme accepteur final d'électrons au niveau du complexe IV, où l'oxygène moléculaire et l'hydrogène se combinent pour former de l'eau. L'énergie libérée par cette succession de réactions redox est couplée à la



sortie de protons ( $H^+$ ) de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire au niveau des complexes I, III et IV.

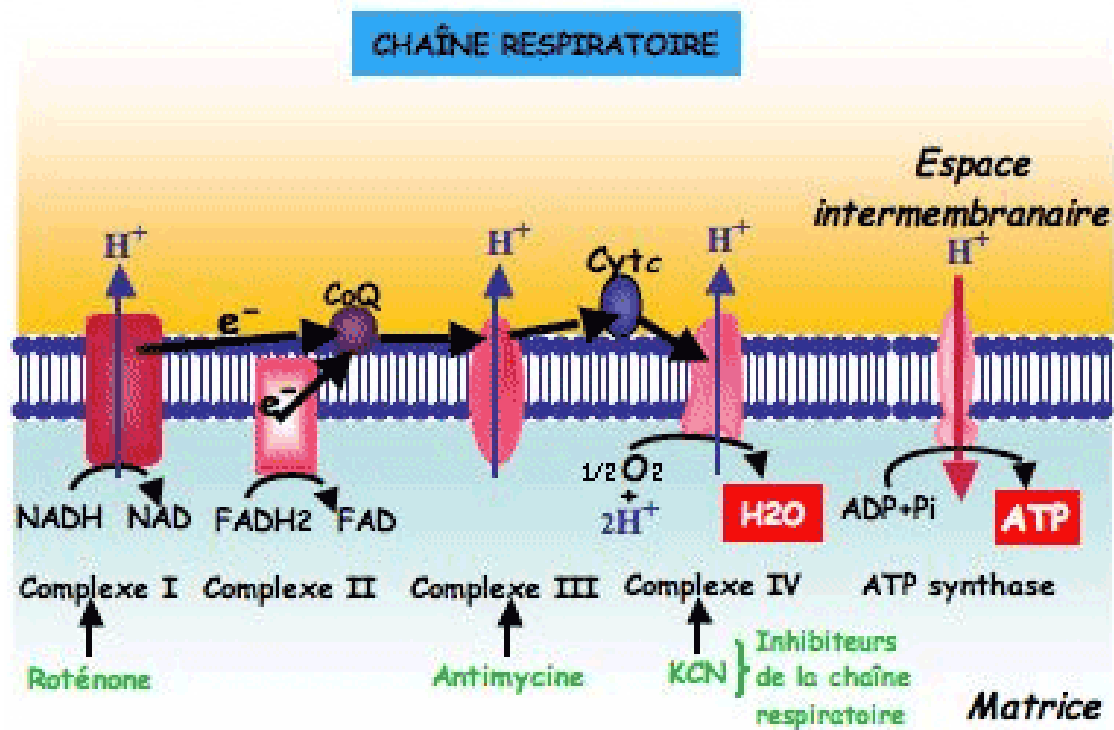


Figure 1: La chaîne respiratoire et ses inhibiteurs.

Cette sortie de protons a comme conséquence la génération d'un potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ) et d'un gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ). Ce sont les deux composantes de la force proton motrice ( $\Delta p$ ). Les protons se retrouvant dans l'espace intermembranaire peuvent passer par l'ATP synthase (complexe V) qui couple la réentrée de protons dans la matrice à la phosphorylation de l'ADP en ATP. L'ATP nouvellement synthétisé est transporté hors de la mitochondrie en échange d'ADP provenant du métabolisme cellulaire. Cet échange implique la translocase des nucléotides adénylés (ANT) et les canaux anioniques dépendants du voltage (VDAC), localisés dans la membrane interne et externe respectivement. ANT et VDAC sont préférentiellement localisés aux points de contacts entre ces deux membranes où ils établissent vraisemblablement un lien fonctionnel [13]. VDAC encore nommée porine, car elle ressemble aux porines de la membrane externe des bactéries, forme un canal qui laisse passer les molécules de petite taille ( $< 10\text{kDa}$ ), telles que des anions, des cations, différents métabolites (acides gras, pyruvate...) et des nucléotides. C'est donc un canal non spécifique. Il en résulte que la composition de l'espace intermembranaire est comparable à celui du cytosol [14, 15].

## **2.2 La production d'espèces réactives de l'oxygène**

La chaîne respiratoire a aussi ses inconvénients. La mitochondrie est reconnue comme une source majeure de production de ROS et les études sur mitochondries isolées montrent que ce serait via les complexes I et III de la chaîne respiratoire [16]. Il est connu qu'environ 2% des électrons sont expulsés de cette chaîne et réagissent avec l' $\text{O}_2$  pour former des espèces réactives dérivées de l'oxygène, mieux connues sous le nom de ROS [17]. Le terme ROS désigne toute espèce oxygénée activée,

radicalaire ou non, réagissant sans apport énergétique ni catalyse avec les substrats organiques. Ces substrats peuvent être des protéines, des lipides, des sucres ou des acides nucléiques. La présence excessive de ROS cause la dénaturation (introduction d'un groupement carbonyle  $C=O$ ) et/ou la fragmentation des protéines et des acides nucléiques, la peroxydation des lipides (ce qui entraîne l'altération du fonctionnement des membranes et des dépôts de lipides oxydés dans les vaisseaux), et, en présence de traces métalliques, l'oxydation du glucose avec libération d' $H_2O_2$  et d' $OH^\circ$ , ce qui engendre des coupures et des mutations de l'ADN. Cependant, des études récentes sur la transduction du signal ont montré que les ROS à faibles concentrations servent aussi de messagers intracellulaires pour induire notamment les mécanismes de défense ou de réparation contre le dommage cellulaire.

L'organisme possède un certain nombre de moyens de défense contre les atteintes des radicaux libres mettant en jeu des enzymes, par l'expression de gènes particuliers, comme les superoxydes dismutases, les catalases, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase, les peroxiredoxines et les thiorédoxines. Les défenses antioxydantes sont capables de faire face et d'éliminer les radicaux libres produits en excès dans l'organisme. On dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si ce n'est pas le cas par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux, l'excès de radicaux est appelé stress oxydant. Des conditions de stress oxydant trop élevées peuvent engendrer le suicide cellulaire ou apoptose.

### 2.3 Mort cellulaire : apoptose versus nécrose

Le terme apoptose est dérivé d'un ancien mot grec (αποπτωσις) qui signifie « la chute des pétales d'une fleur ou des feuilles d'un arbre en automne ». Ce processus de mort programmé permet l'élimination des cellules non désirées, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie. Les cellules mourantes rétrécissent et se détachent des cellules environnantes. Le cytoplasme et le noyau se condensent. Il y a rupture du nucléole et de la membrane nucléaire et un désassemblage des structures fondamentales. De plus, il y a condensation de la chromatine et la membrane plasmique forme des protrusions qui peuvent être expulsées pour former des corps apoptotiques. En plus des modifications morphologiques observées, il y a également des modifications biochimiques qui prennent place. Une des plus notables est probablement le clivage de la chromatine condensée en fragments internucléosomals de 180-200 paires de bases [18-20]. Une autre manifestation précoce de l'apoptose implique l'externalisation des molécules de phosphatidylsérine, qui résident normalement du côté cytosolique de la membrane plasmique. Suivant un stimulus apoptotique, ces molécules pivotent du côté extra-cellulaire de la membrane plasmique [21-23], servant de stimulus déclencheur pour la phagocytose de la cellule apoptotique ou des corps apoptotiques par les macrophages et les cellules phagocytaires non professionnelles [24, 25].

Une caractéristique essentielle de l'apoptose est qu'elle se déroule sans provoquer d'inflammation. L'apoptose se distingue en ce sens de la nécrose, l'autre façon dont peut mourir une cellule qui est beaucoup plus dommageable pour

l'organisme. En effet, la nécrose est une mort cellulaire accidentelle qui survient lors d'un dommage tissulaire (anoxie aiguë, un manque soudain de nutriments, ou lors de dommages extrêmes physiques ou chimiques). Contrairement au rétrécissement des cellules apoptotiques, les cellules nécrotiques et leurs organelles perdent leur habilité à maintenir l'homéostasie osmotique et commencent à gonfler à la suite d'une importante entrée d'eau [26]. Les cellules abîmées deviennent alors oedémateuses, puis leurs membranes cellulaires éclatent, déversant le contenu cellulaire dans l'espace interstitiel environnant, ce qui provoque une inflammation.

L'apoptose est le point final d'une cascade d'événements demandant de l'énergie qui est initiée par un stimulus de mort cellulaire. Le phénomène de l'apoptose semble se dérouler en quatre phases qui se chevauchent partiellement [27] (Figure 2) :

1. La phase précoce ou initiale au cours de laquelle un stimulus provoque ou initie la réponse apoptotique. Ce stimulus peut être un facteur externe qui active des récepteurs à la surface de la cellule ou peut provenir de l'intérieur de la cellule lorsque certaines organelles ou l'ADN nucléaire sont endommagés.
2. La phase de transduction du signal au cours de laquelle le stimulus inducteur enclenche une cascade de signalisation visant l'activation de la machinerie effectrice de la mort cellulaire.

3. La phase effectrice au cours de laquelle les caspases, des protéases effectrices activées, ainsi que d'autres protéines de signalisation, procèdent au démantèlement de la cellule.
4. La phase postmortem au cours de laquelle la chromatine et l'ADN de la cellule sont dégradés.

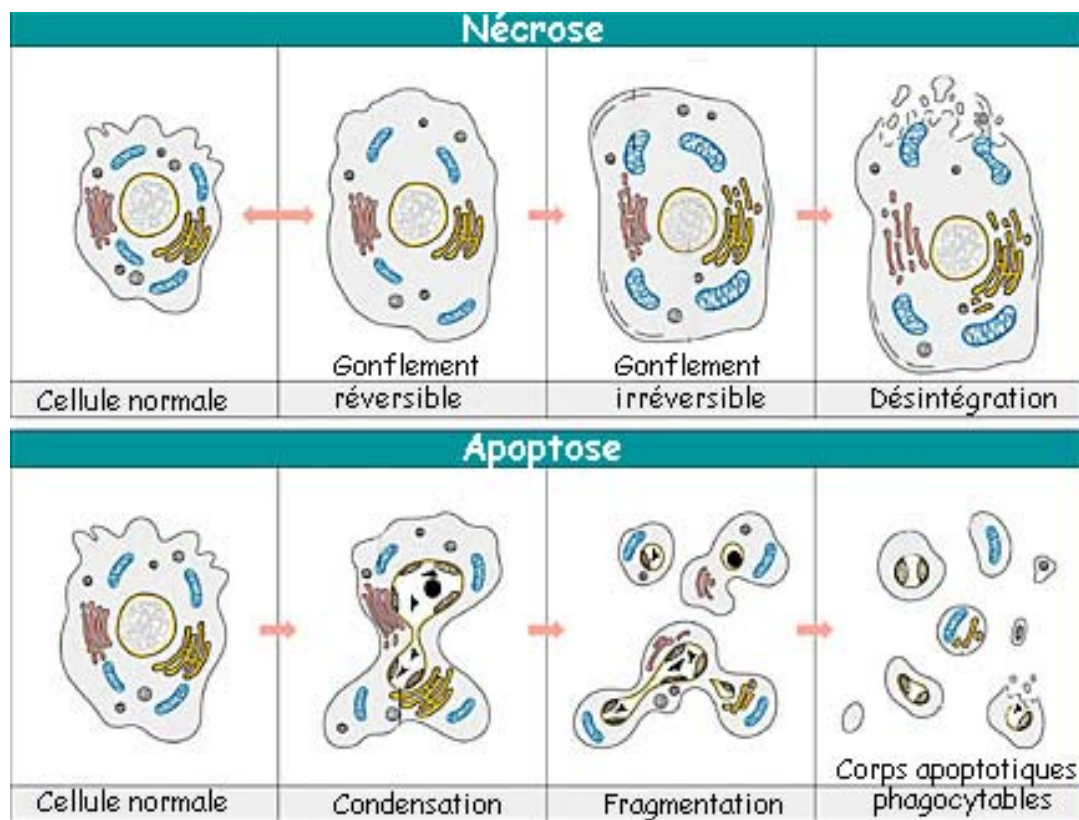
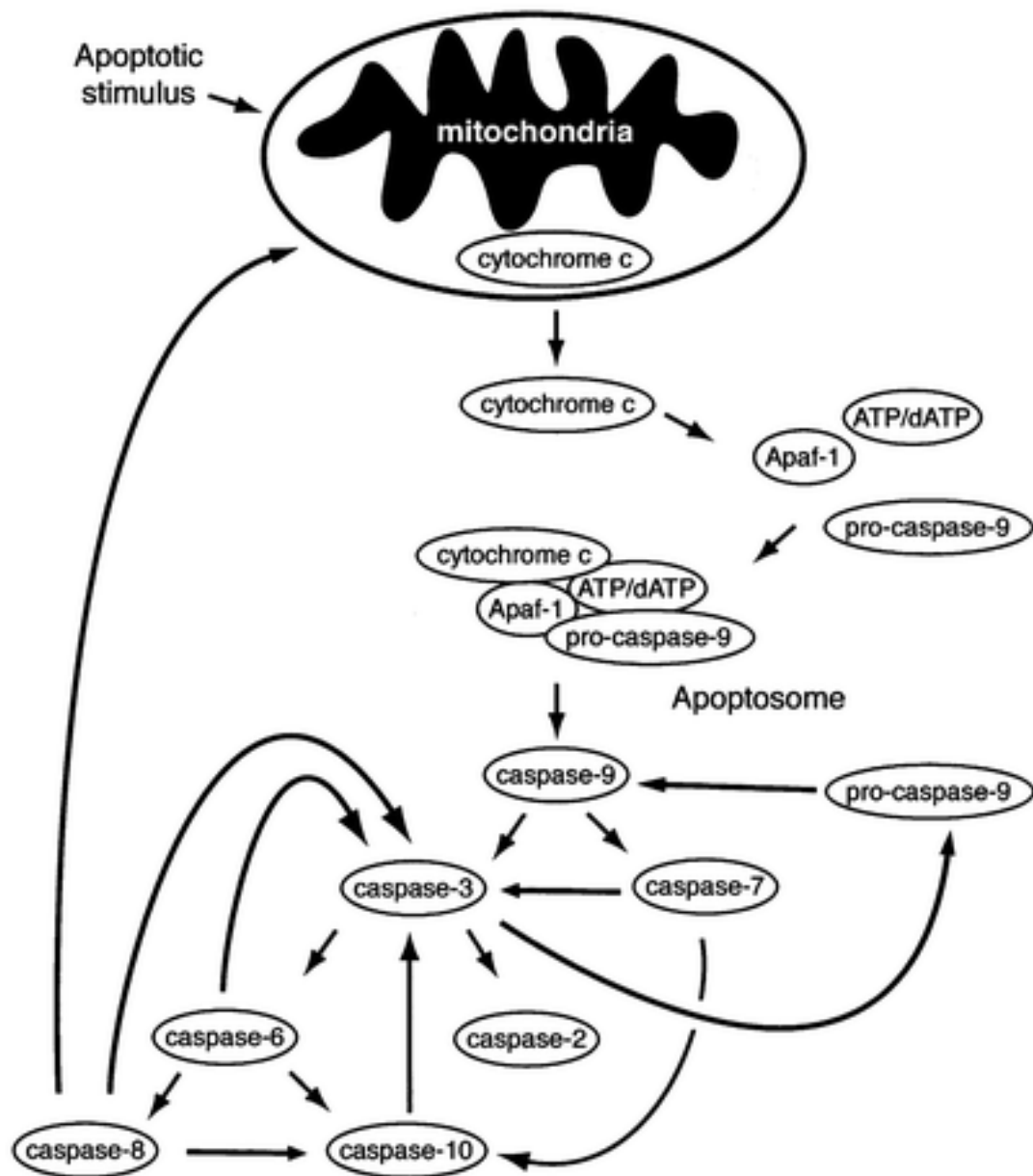


Figure 2: Comparaison des étapes clés de l'apoptose et de la nécrose.



Il existe deux grandes voies par lesquelles l'apoptose peut être induite dans une cellule: la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Bien que les événements initiaux menant à l'apoptose diffèrent dans chacun des cas, les deux voies ont en commun de mener à l'activation des caspases (Figure 3), ce qui constitue un point de non-retour pour la cellule.

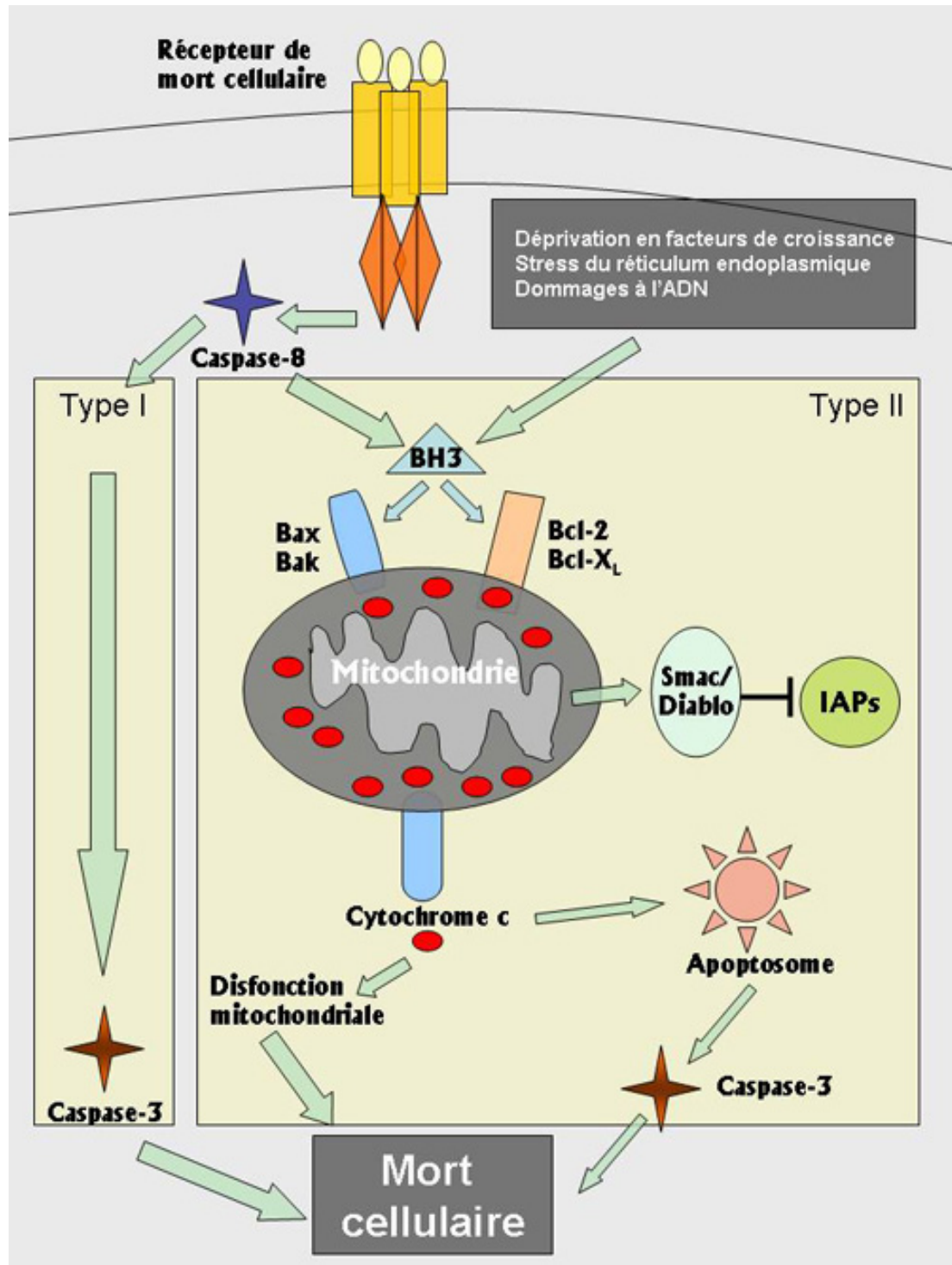
Les caspases (de l'anglais *cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases*) sont un groupe de protéases à cystéine, présentes dans le cytoplasme et certaines organelles, sous forme de procaspases inactives. Les procaspases sont clivées et dimérisées pour former les caspases actives. Chez les mammifères, il existe quatorze caspases différentes [28], appartenant à la famille des caspases inflammatoires (1, 4 et 5), des caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) et des caspases effectrices (3, 6 et 7) [29-33]. Les caspases 12, 13 et 14 ne sont pas encore bien catégorisées, mais feraient vraisemblablement partie de la famille des caspases inflammatoires. Les caspases initiatrices sont les premières à être activées par des signaux extrinsèques ou intrinsèques à la cellule. Il est bien documenté que les signaux extrinsèques mènent au clivage et à l'activation des caspases initiatrices 8 et 10 alors que les signaux intrinsèques mènent à l'activation de la caspase initiatrice 9 (Figure 3). Cette cascade cause éventuellement l'activation des caspases effectrices qui clivent une variété de substrats incluant des inhibiteurs de nucléases, le cytosquelette et d'autres protéines clé de la cellule, amenant ainsi une dégradation de l'ADN nucléaire et des changements morphologiques typiques de la cellule apoptotique [34-38].



**Figure 3: La cascade des caspases.** Un des événements précoces de l'activation de la cascade des caspases est la formation de l'apoptosome qui permet l'activation de la caspase 9. Les caspases 3 et 7 semblent ensuite être activées simultanément par la caspase 9. L'activation de la caspase 3 permet à son tour l'activation des caspases 2 et 6, puis des caspases 8 et 10.

### **2.3.1 La voie extrinsèque**

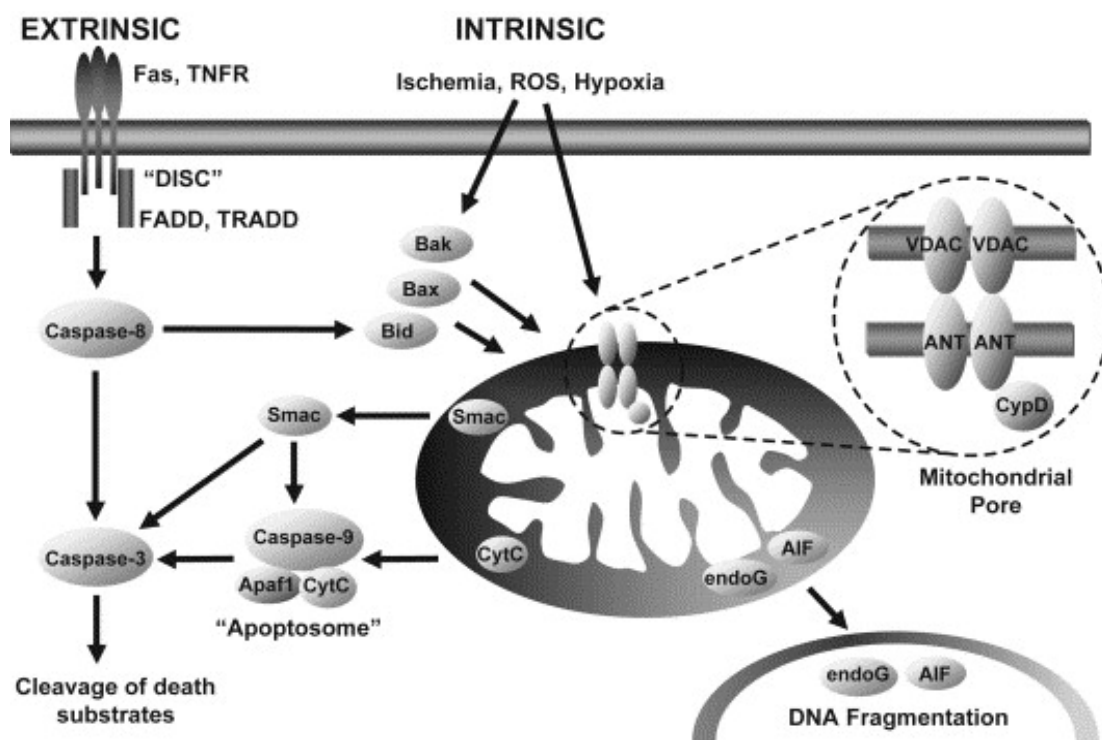
La voie extrinsèque de l'apoptose est souvent appelée la voie des récepteurs de mort cellulaire, du fait que c'est la liaison entre un récepteur à la surface de la cellule et son ligand qui enclenche le processus. L'enclenchement de l'apoptose se fait quand un ligand se lie sur la portion N-terminale extracellulaire du récepteur. Ceci mène à la trimérisation du récepteur et son activation. Il y a alors recrutement de protéines, dont certaines procaspases initiatrices, via la portion c-terminale cytoplasmique du récepteur. En fonction du type cellulaire, l'activation des récepteurs de mort résultera en une activation directe de caspases effectrices ou encore à l'activation de Bid et au relargage subséquent de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux [39, 40] (Figure 4).



**Figure 4: Les voies extrinsèques de la mort cellulaire.** Dans la voie extrinsèque, un récepteur enclenche le processus de mort cellulaire. La voie extrinsèque implique l'activation des protéines BH3 de la famille des Bcl-2 et le largage de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie.

### 2.3.2 La voie intrinsèque

Alors que la voie extrinsèque est déclenchée par des facteurs extérieurs à la cellule, la voie intrinsèque a pour éléments déclencheurs des insultes intracellulaires, comme la surcharge calcique, l'augmentation du niveau de ROS, des dommages à l'ADN, un stress originant du réticulum endoplasmique, l'activation d'oncogènes et des dommages mitochondriaux [40]. Via diverses voies de signalisation intracellulaire, ces insultes convergent vers la mitochondrie et exercent différents effets dont le plus important dans le processus d'induction de la mort cellulaire est l'augmentation soudaine de la perméabilité des membranes mitochondriales (Figure 5). Cette perméabilisation engendre plusieurs effets délétères, notamment la perte du potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\psi$ ), le découplage de la chaîne respiratoire et la relâche de plusieurs facteurs pro-apoptotiques résidant normalement dans la mitochondrie, incluant le cytochrome c, AIF, SMAC/DIABLO, l'endonucléase G la sérine-protéase OMI/Htr A2 et possiblement plusieurs pro-caspases [41-43]. Ces protéines agissent à différents niveaux dans la cascade d'activation de l'apoptose (Figure 5). Le cytochrome c se lie au facteur protéique associé à l'apoptose (APAF-1) et à la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome permettant ainsi l'activation de la caspase 3 effectrice [44]. Le facteur d'induction de l'apoptose (AIF) [45] et l'endonucléase G [46] migrent vers le noyau et entraînent la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN nucléaire. SMAC/DIABLO [47] et OMI/Htr A2 ont quant à elles une action inhibitrice sur les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP et XIAP), dont le rôle est de limiter la formation de l'apoptosome.



**Figure 5: Représentation schématique des voies de mort cellulaire intrinsèque et extrinsèque qui régulent l'apoptose chez le mammifère. Adapté de Baines et Molkentin 2005.**

Les mécanismes de perméation mitochondriale, bien qu'encore mal connus, semblent multiples. Les deux grands mécanismes documentés sont :

1. La formation de pores protéiques par les membres pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2.
2. La formation du pore de perméabilité transitionnelle mitochondriale (PTP), qui est le mécanisme principalement visé dans cette thèse.

## **2.4 Mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales**

### **2.4.1 La famille des Bcl-2**

La famille des protéines des lymphomes 2 à cellules B (Bcl-2) est composée de protéines 1) anti-apoptotiques (*i.e.*, Bcl-2 and Bcl<sub>XL</sub>), et 2) pro-apoptotiques [48, 49], ces dernières étant subdivisées en protéines pro-apoptotiques à *a*) domaines multiples (*i.e.* Bak, Bax) ou à *b*) domaine BH3 (*i.e.* Bid, Bad, Bim, Bmf, Noxa, Puma, BNip3 et Nix). Le mécanisme central dans ce type de perméabilisation est le changement de conformation et l'activation des protéines multi-domaines Bax et Bak. Ce processus permet leur oligomérisation et leur insertion dans la membrane mitochondriale externe, menant à la perméabilisation et à la relâche de facteurs pro-apoptotiques (Figure 5). Bax est normalement localisée dans le cytosol sous sa forme inactive et migre à la mitochondrie, en réponse à des stimuli apoptotiques [50]. Bak est quant à elle présente de manière constitutive dans la membrane mitochondriale externe, mais est maintenue sous sa forme inactive, présumément via sa liaison avec VDAC2. La formation d'oligomère Bax/Bak est favorisée par les protéines à domaine BH3 qui sont couplées à des cascades de signalisation et agissent comme relais pour activer la perméabilisation mitochondriale à la suite de signaux apoptotiques. À titre

d'exemple, il est connu que la protéine Bid est clivée en tBid en condition de stress comme l'ischémie-réperfusion, ce qui cause sa migration à la mitochondrie où elle facilite l'action de Bak. L'activation de Bad semble également exercer le même genre de rôle facilitateur sur Bak. Par ailleurs, l'action de ces protéines pro-apoptotiques est antagonisée par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl<sub>XL</sub>. Ces protéines résident en permanence dans la membrane mitochondriale externe et inhibent la perméabilisation, probablement en formant des dimères avec Bax et Bak, inhibant ainsi leur oligomérisation [51].

#### **2.4.2 Le PTP**

La transition de perméabilité a été initialement décrite sur des mitochondries isolées comme une augmentation soudaine de la perméabilité aux solutés en présence de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  [52-54]. Bien que ce phénomène ait initialement été attribué à un dommage membranaire non spécifique, il est maintenant reconnu que l'ouverture du PTP, un canal non spécifique de haute conductance localisé dans la membrane mitochondriale interne, en est responsable [55]. L'ouverture prolongée du PTP permet l'équilibration des solutés de 1 500 Da et moins, de part et d'autre de la membrane. Ceci engendre plusieurs conséquences importantes dont la perte de  $\Delta\Psi$ , le découplage de la chaîne respiratoire et une hydrolyse massive de l'ATP causée par le fonctionnement en mode reverse de l'ATP synthase. À tout le moins *in vitro* sur mitochondries isolées et incubées dans des tampons à base de sucrose ou de KCl, l'ouverture du PTP engendre également un gonflement de la matrice mitochondriale qui est substantiel, compte tenu que la membrane interne, avec sa grande surface et ses nombreux replis, possède une grande capacité d'accommodement. En



contrepartie, puisque la surface de la membrane externe est beaucoup moindre, ce gonflement matriciel engendre éventuellement la rupture de la membrane externe et la relâche des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux mentionnés précédemment.

Dans plusieurs types de cellules et particulièrement dans les cardiomyocytes, la majeure partie de la production d'ATP est assurée par les mitochondries. Compte tenu des effets catastrophiques de l'ouverture du PTP sur l'équilibre énergétique, son ouverture massive et prolongée a surtout été mise en cause dans la nécrose [56, 57]. Cependant, il existe des indices indiquant qu'une ouverture momentanée ou dans un nombre de mitochondries insuffisant pour induire une catastrophe énergétique pourrait constituer un mécanisme d'activation de l'apoptose dépendant du PTP [56, 57].

#### **2.4.2.1 Régulation du PTP**

La régulation de l'ouverture du PTP, qui est complexe et implique un grand nombre de modulateurs est assez bien caractérisée (voir tableau I pour un sommaire). L'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale est l'activateur principal de l'ouverture du PTP [58-60]. Cependant, plusieurs autres facteurs facilitent l'ouverture du PTP notamment en augmentant sa sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ . La présence de phosphate inorganique, la baisse du potentiel de membrane, le stress oxydant, l'oxydation des nucléotides pyrimidiques (NADH et NADPH), l'alcalinisation de la matrice ( $\text{pH} > 7,6$ ), le flux d'électrons au niveau du complexe I ainsi que la déplétion des réserves endogènes en nucléotides adénylés, particulièrement l'ADP et l'ATP, sont tous des facteurs qui favorisent l'ouverture du PTP. À l'opposé plusieurs cations divalents

( $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ ), et possiblement certains cations mono ou trivalents, inhibent l'ouverture du PTP probablement en agissant comme antagonistes compétitifs du  $Ca^{2+}$  [52, 61-63]. Par ailleurs, il a également été démontré que Bid et Bax favorisent l'ouverture du PTP alors que Bcl-2 et Bcl<sub>XL</sub> l'inhibent [48, 49, 64, 65].

L'ouverture du PTP peut être modulée par une variété d'agents pharmacologiques qui sensibilisent ou désensibilisent le pore à l'ouverture, en réponse à un stimulus inducteur donné. Ces agents agissent souvent de manière indirecte, en affectant un ou plusieurs des facteurs favorisant l'ouverture du PTP [55]. C'est le cas notamment d'agents antioxydants et d'inhibiteurs du transport mitochondrial du  $Ca^{2+}$  comme le rouge de ruthenium. Cependant, en 1988, l'équipe de Martin Crompton a rapporté que la cyclosporine-A, un agent immuno-supresseur utilisé pour le traitement du rejet de greffe post-transplantation, inhibait de manière spécifique l'ouverture du PTP à des concentrations inférieures à 1  $\mu M$  [66]. Cette découverte a permis par la suite de grandes avancées dans l'étude de la structure moléculaire du PTP, incluant l'identification de la cyclophiline D (CypD), une protéine matricielle de 18 KDa à laquelle se lie spécifiquement la CsA pour inhiber son interaction avec d'autres composantes protéiques du pore [67].

**Tableau I: Régulation de l'ouverture du PTP par différents effecteurs physiologiques**

<b>Agent/point de contrôle</b>	<b>Probabilité d'ouverture du PTP</b>	<b>Référence</b>
Ca <sup>2+</sup> matriciel	Augmentée	[52-54, 68]
Mg <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> matriciel	Diminuée	[52-54]
Oxydants	Augmentée	[69]
ATP	Diminuée	[68]
ADP	Diminuée	[70]
Cyclosporine A (CsA)	Diminuée	[66]
pH matriciel	Une diminution du pH diminue la probabilité	[62]
P <sub>i</sub>	Augmentée	[52-54]
Potentiel de surface	Une réduction entraîne une diminution de la probabilité	[71]
Voltage	Une augmentation du voltage entraîne une diminution de la probabilité	[48, 49, 64, 65]
Bax, Bid	Augmentée	
Bcl-2, Bcl <sub>XL</sub>	Diminuée	

#### 2.4.2.2 Structure du PTP

Malgré la découverte de la CsA et la caractérisation fonctionnelle détaillée du PTP, son identité moléculaire n'est pas encore clairement établie et suscite de vifs débats [60, 72, 73]. Cependant, il est assez bien admis que le PTP est composé de plusieurs protéines qui jouent des rôles spécifiques en condition physiologique normale et qui, en condition de stress, s'assemblent pour former des canaux non spécifiques à haute conductance.

L'hypothèse initiale fut que le PTP serait constitué de trois unités principales : l'échangeur ATP/ADP (ANT), la porine (VDAC) et la cyclophiline-D. Ces protéines formeraient des complexes au niveau des sites de contacts entre les membranes interne et externe, auxquels s'associeraient d'autres protéines incluant plusieurs kinases, certains membres de la famille Bcl-2, ainsi que le récepteur à la benzodiazépine [56]. Cette hypothèse était basée principalement sur le fait que:

- l'ouverture du PTP est régulée par des ligands de l'ANT et de CypD [74].
- l'ANT, VDAC ou des complexes ANT-VDAC-CypD isolés et reconstitués dans des liposomes ou dans une bi-couche de phospholipides présentent certaines des caractéristiques de conductance et de régulation du PTP [55].

Cependant, une faiblesse de ces études est que CypD se lie à plusieurs protéines outre ANT [73] et qu'il est impossible de déterminer si ANT et VDAC, et non d'autres protéines isolées conjointement, sont celles qui présentent les caractéristiques du PTP une fois reconstituées dans les membranes artificielles. Des

études récentes utilisant des stratégies transgéniques, avec lesquelles les gènes de ces protéines ont été sélectivement inactivés, démontrent que la composition moléculaire du PTP est probablement plus compliquée.

En effet, le groupe de Wallace a récemment démontré qu'il était possible d'induire l'ouverture du PTP par surcharge calcique sur des mitochondries isolées, à partir du foie de souris transgéniques présentant une délétion des deux isoformes de l'ANT [75]. Cette étude suggère donc qu'en l'absence d'ANT, d'autres protéines peuvent se substituer pour former le PTP, lorsque les mitochondries sont soumises à un stress calcique. Cependant, la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  requise pour ouvrir le PTP dans ces mitochondries était deux à trois fois plus importante que la quantité requise dans les mitochondries des souris contrôles. De plus, en absence d'ANT, la régulation du PTP par des ligands de l'ANT, tels que l'atractyloside et l'acide bonkrekique, était abolie. Par contre, l'ouverture du PTP était encore sensible à la CsA, indiquant que la liaison de la CypD à d'autres protéines que l'ANT peut réguler l'ouverture du PTP. Dans l'ensemble, ces données suggèrent donc que l'ANT n'est pas la seule protéine capable de former le PTP, mais qu'elle participe probablement à titre de protéine régulatrice ou comme composante intégrale du pore lorsqu'elle est exprimée normalement. En ce qui a trait à VDAC, une étude publiée par le groupe de Molkenin a démontré que la susceptibilité à l'ouverture du PTP, en réponse au  $\text{Ca}^{2+}$  et au stress oxydant, était similaire en absence ou en présence des trois isoformes de VDAC, suggérant clairement que VDAC n'est ni une protéine constituante ni un régulateur du PTP [76].

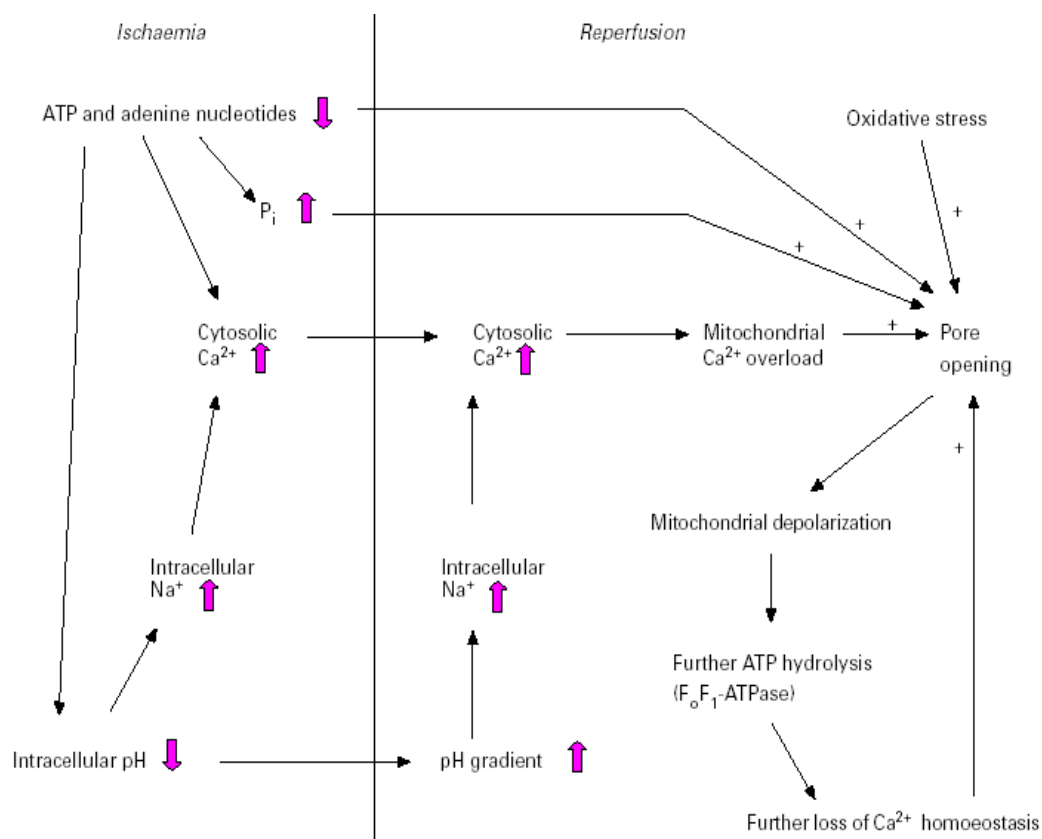
Par ailleurs, plusieurs groupes de recherche, dont ceux de Molkenin, Bernardi et Korsmeyer ont généré des souris présentant une délétion du gène de la cyclophiline D (souris  $Ppif^{-/-}$ ) [72, 77, 78]. Toutes ces études ont rapporté que l'ouverture du PTP était possible dans les mitochondries isolées à partir du foie des souris  $Ppif^{-/-}$  [72, 77]. Cependant, la quantité de  $Ca^{2+}$  requise pour y arriver était significativement supérieure à celle qui était requise pour ouvrir le PTP dans les mitochondries provenant des souris contrôles. De plus, l'effet inhibiteur de la CsA était absent dans les mitochondries  $Ppif^{-/-}$ , confirmant que la CypD est bel et bien la cible de la CsA [72, 77]. Cependant, la régulation du PTP par des modulateurs qui ne dépendent pas de la CypD était similaire dans les mitochondries provenant des souris contrôles et  $Ppif^{-/-}$  [77]. Ces études ont également démontré que l'absence de CypD causait une diminution de la mort cellulaire induite par le stress oxydant et l'ischémie-réperfusion [72, 79] et qu'à l'opposé, sa surexpression était associée à l'activation de la voie mitochondriale de la mort cellulaire caractérisée par une relâche accrue de cytochrome c, l'activation de la caspase 9 et l'apparition de fragmentation de l'ADN nucléaire [72]. Prises dans leur ensemble, ces études ont mené à la suggestion que la CypD est probablement une protéine régulatrice, plutôt qu'une composante structurale du PTP.

Le phosphate est connu depuis longtemps comme un activateur de l'ouverture du PTP, cependant le rôle potentiel du transporteur au phosphate mitochondrial (PiC) dans la formation du PTP est reconnu depuis peu. Dans une étude récente, il a été

démontré que la Cyp-D se lie au PiC et que cette liaison peut être empêchée par la CsA. Cette interaction est augmentée par le stress oxydant qui sensibilise le PTP au  $\text{Ca}^{2+}$  [80]. Ces études ont également observé une relation importante entre l'inhibition du PTP et le transport du phosphate dans la mitochondrie [80, 81]. Il a aussi été démontré que le phosphate est requis pour l'inhibition du PTP en bloquant la Cyp-D [82]. Les cellules HeLa PiC<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'induction de l'apoptose par la staurosporine et la surexpression de PiC induit l'apoptose [83]. D'autres études sont cependant requises pour établir le lien causal entre la formation du PTP et du PiC.

#### **2.4.2.3 Rôle du PTP dans l'ischémie-réperfusion**

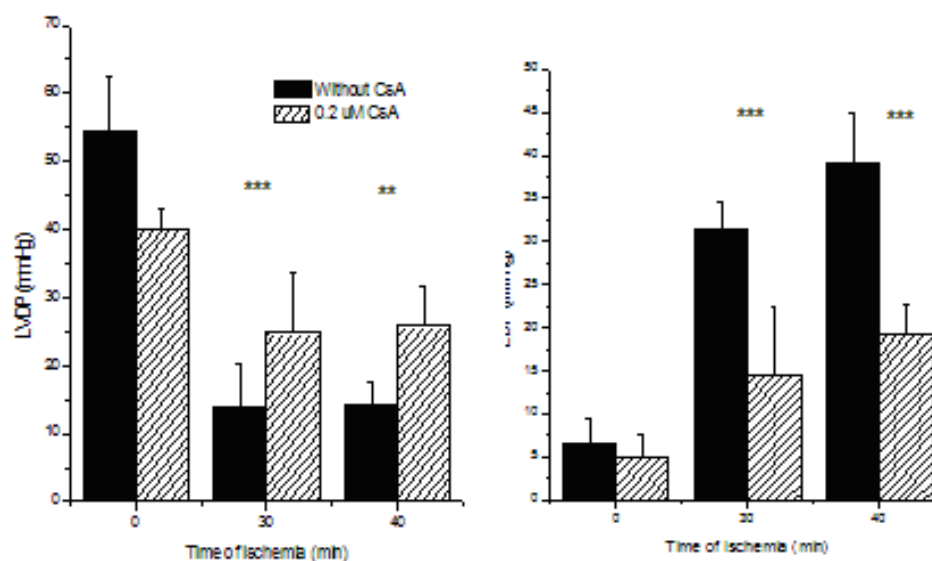
Dans les études réalisées au cours de cette thèse, l'ischémie-réperfusion a été utilisée comme modèle de stress permettant de démasquer une vulnérabilité mitochondriale dans le cœur, soit en cours de remodelage hypertrophique ou dans la phase précédant la cardiopathie chez la souris *mdx*. Ce modèle a été choisi notamment parce que le rôle du PTP dans les dommages ischémiques est bien établi [84], tel que brièvement exposé dans cette section. Initialement, l'hypothèse que l'ouverture du PTP pourrait jouer un rôle important a été suggérée après la constatation que plusieurs des conditions requises pour ouvrir le PTP *in vitro* (tableau I section 2.3.2.1) sur mitochondries isolées prévalaient dans les cardiomyocytes, à la suite d'une période d'ischémie (Figure 6)[59].



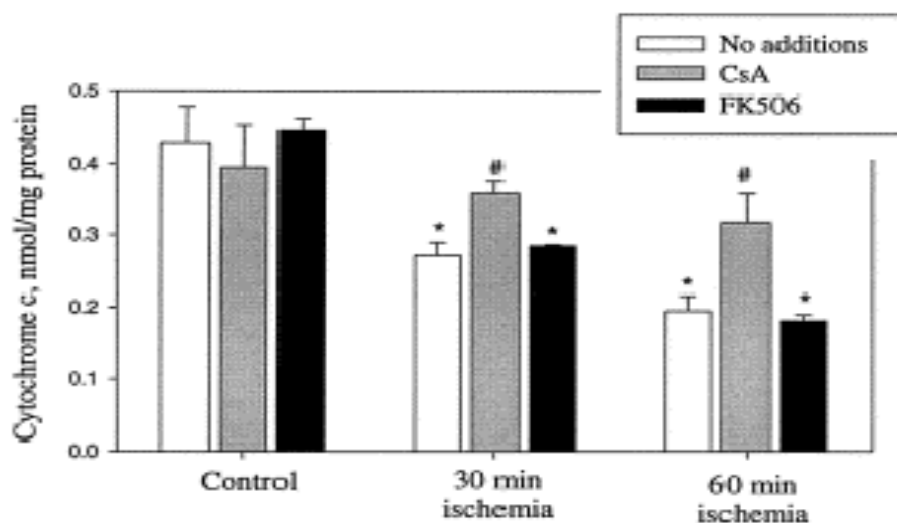
**Figure 6: Facteurs contribuant à l'ouverture du PTP à la suite de l'ischémie-réperfusion.** Le manque d'oxygène et de substrats énergétiques entraîne une abolition de l'oxydation phosphorylante, une diminution rapide du contenu en ATP, ainsi que l'accumulation de  $P_i$  de  $H^+$  et de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Lors de la réperfusion, la repolarisation partielle des mitochondries permet une accumulation importante de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie. Par ailleurs, le rétablissement du flux d'électrons au niveau des complexes de la chaîne respiratoire qui ont été endommagés au cours de l'ischémie engendre une augmentation de la production de radicaux libres. L'ensemble de ces facteurs crée un environnement hautement favorable à l'ouverture du PTP. Adapté de (Crompton 1999).



L'utilisation de CsA sur le cœur isolé perfusé ou sur des cardiomyocytes isolés soumis à l'I-R a, par la suite, apporté un support important à cette hypothèse. En effet, plusieurs effets bénéfiques de la CsA ont été rapportés, incluant une meilleure récupération de la pression ventriculaire systolique [85] (Figures 7) et de l'équilibre des adénylates [85], une diminution de l'hypercontracture [85] et une réduction de la taille de la zone nécrotique [86] à la suite de l'I-R. De plus, l'administration de CsA durant l'I-R a été associée à une diminution de la relâche de cytochrome c (Figure 8) et une atténuation des dysfonctions respiratoires mesurées sur les mitochondries isolées à l'issue de la réperfusion [87].

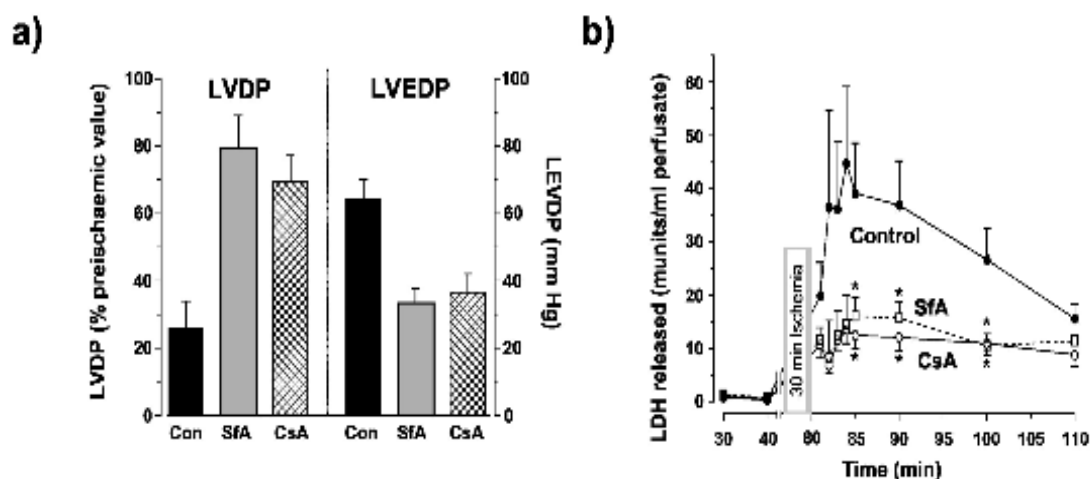


**Figure 7: Effet de la CsA sur la fonction contractile du cœur soumis à une ischémie-réperfusion.** La figure présente la pression développée par le ventricule gauche (LVDP) et la pression diastolique (EDP), lors de la 15<sup>e</sup> minute de réperfusion suivant une ischémie de 30 ou 40 minutes en présence ou en absence de CsA. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. (\*\*  $P < 0,02$ , \*\*\*  $P < 0,01$ ). Adapté de (Griffiths et al 1993).



**Figure 8: Effet de la CsA sur le contenu mitochondrial en cytochrome c après une période d'ischémie.** La CsA diminue la quantité de cytochrome c relâchée par les mitochondries cardiaques durant l'ischémie. Cependant, le FK-506, un inhibiteur de la calcineurine est sans effet. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. \* : significativement différente vs contrôle dans la même condition expérimentale ( $P < 0,01$ ); # : Significativement différente la condition sans traitement dans la même condition de perfusion ( $P < 0,05$ ). Adapté de (Borutaite et al. 2003).

Cependant, une des limites inhérentes à l'utilisation de la CsA sur l'organe ou la cellule entière est le fait que la CsA inhibe également la calcineurine, une phosphatase  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-dépendante cytosolique qui peut être impliquée dans la mort cellulaire [88, 89], ce qui ne permet pas de conclure hors de tout doute que l'effet bénéfique de la CsA est exclusivement relié à l'inhibition du PTP. Cependant, plusieurs études ont maintenant démontré que l'effet de la CsA est médié par l'inhibition du pore. En effet, l'administration de FK-506, un inhibiteur de la calcineurine qui n'affecte pas l'ouverture du PTP, s'est avéré inefficace pour réduire la taille de l'infarctus [86], et des témoins de l'activation de l'apoptose tels que la relâche de cytochrome c (Figure 8), l'activation des caspases ainsi que la fragmentation de l'ADN nucléaire [87]. De plus, plusieurs analogues de la CsA tels la N-méthyl-valine cyclosporine (Met-Val-CsA) [88], la N-méthyl-isoleucine-cyclosporine (NIM811) [90] et la sanglifehrin A [91], qui ont des effets inhibiteurs sur le PTP mais n'interagissent pas avec la calcineurine, se sont avérés d'une efficacité comparable à la CsA (Figures 8a).



**Figure 8a: Effet de la CsA et de la Sanglifehrin-A, un analogue non immunosuppresseur sur la fonction contractile et le dommage tissulaire à la suite d'une période d'ischémie-réperfusion.** La Sanglifehrin-A (SfA) et la CsA protègent le cœur ischémiq ue lors de la réperfusion. Les cœurs de rats ont été perfusés en mode Langendorff. Après 50 minutes, le cœur a été soumis à une ischémie de 30 minutes. 0.2µM de CsA ou 1µM de SfA a été ajouté trois ou dix minutes avant l'ischémie. (A) Les valeurs de LVDP et de LVEDP post-ischémie sont significativement différentes ( $p < 0,001$ ) dans les groupes CsA et SfA vs le groupe contrôle. (B) La relâche de LDH post-ischémie est significativement différente (\*  $p < 0,05$ ) dans les groupes CsA et SfA vs le groupe contrôle (Clarke et al 2002).

Une des limites des approches pharmacologiques utilisées dans l'ensemble de ces études est que les effets bénéfiques sur la fonction et le dommage tissulaire sont attribués à une inhibition de la perméabilité transitionnelle sans toutefois pouvoir le confirmer à l'aide d'une quantification directe de l'ouverture du PTP [88]. Cependant, la mise au point de la technique de séquestration mitochondriale du 2-[<sup>3</sup>H]-deoxyglucose, par le laboratoire d'Andrew P. Halestrap en 1995, a permis de mesurer l'ouverture du PTP lors d'un protocole de perfusion cardiaque [92]. De plus, le groupe de Halestrap a démontré avec cette technique qu'une diminution de l'ouverture du PTP est suivie d'une meilleure récupération fonctionnelle, lors d'un protocole d'I-R. Nous avons également publié des résultats à l'aide de cette méthode d'abord chez le Rat ([1] + étude 1). Au cours de cette thèse nous avons également apporté des modifications permettant d'adapter la technique pour la perfusion de cœurs de souris (études 2, 3, 4).

### **3 RÔLE DES MITOCHONDRIES DANS LE REMODELLAGE HYPERTROPHIQUE DU CŒUR ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE**

#### **3.1 Introduction**

Le remodelage ventriculaire hypertrophique est une réponse du cœur à une variété de stress, incluant la surcharge de travail chronique ou la perte de masse cardiaque à la suite d'un infarctus ou une d'activation neuroendocrine [93]. Cette réponse est accompagnée par de multiples changements au niveau des cardiomyocytes et de la matrice extracellulaire [93-95]. Certains de ces changements, sinon la majorité, apparaissent délétères à long terme puisqu'ils sont associés à une

augmentation de la mortalité et de la morbidité [96, 97] et une progression vers l'insuffisance cardiaque [93].

Comme dans tous les pays occidentaux, au Canada, l'impact socio-économique de l'insuffisance cardiaque est en croissance. Ceci est relié d'une part au fait que la population canadienne est vieillissante et que cette pathologie affecte de manière prépondérante les personnes âgées. D'autre part, l'amélioration des traitements pour l'hypertension chronique et les maladies coronaires ont permis d'augmenter le taux de survie relié à ces pathologies, augmentant ainsi la prévalence de complications tardives telles l'insuffisance cardiaque. Au Canada, les maladies cardiovasculaires, dont l'insuffisance cardiaque est une des principales affections, sont une cause majeure d'hospitalisation. Les maladies du cœur et les AVC coûtent à l'économie canadienne plus de 22,2 milliards de dollars annuellement en services médicaux, en coûts hospitaliers, en perte de salaire et en perte de productivité [98]. L'insuffisance cardiaque atteint plus de 400 000 Canadiens et 50 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année [99]. De même, aux États Unis, plus de cinq millions d'individus souffrent d'insuffisance cardiaque chronique et l'incidence de cette maladie est en hausse [100].

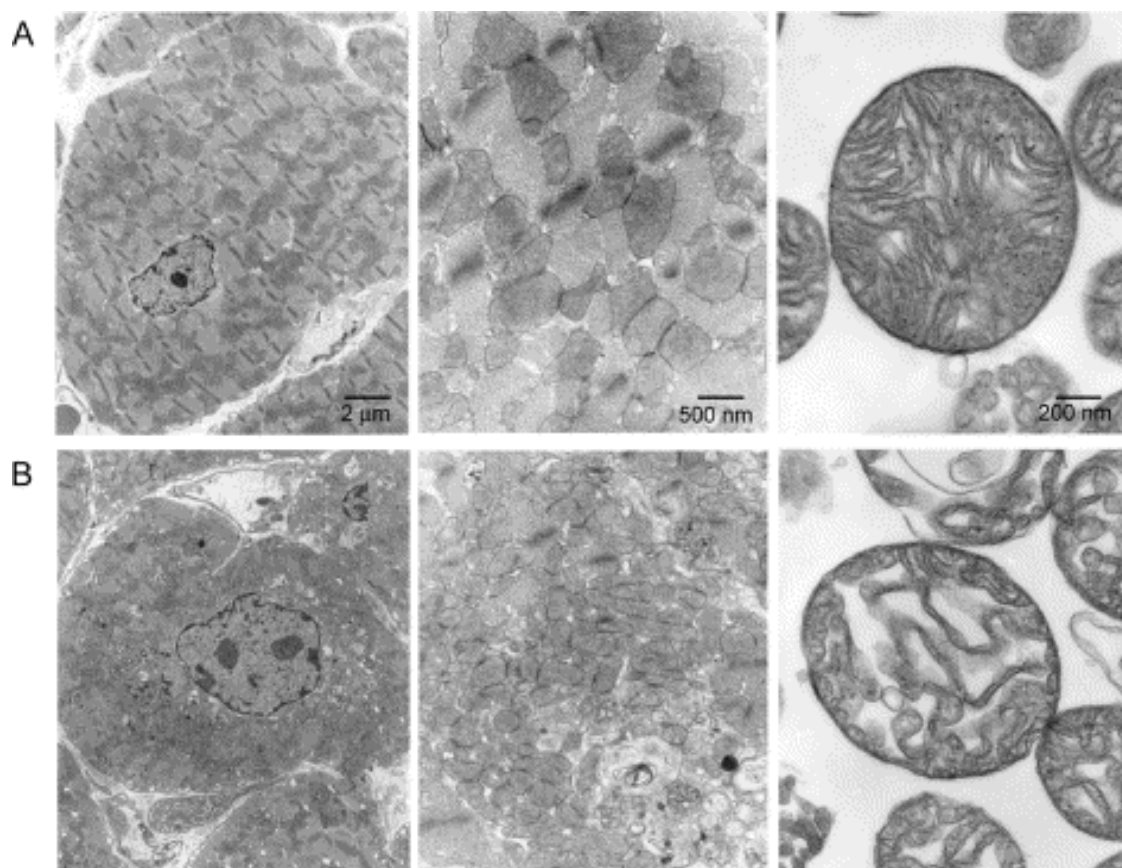
Malgré l'association bien documentée entre l'hypertrophie cardiaque et le développement de l'insuffisance cardiaque, les raisons pour lesquelles certains cœurs hypertrophiés progressent vers la décompensation alors que d'autres ne progressent pas vers cet état de défaillance systolique sont encore mal connues [93, 95]. Parmi les facteurs potentiellement impliqués dans la pathogenèse de l'insuffisance cardiaque,

les mitochondries ont fait l'objet de nombreuses études, étant donné leur rôle central dans la production d'énergie et de radicaux libres [101, 102]. Tel que discuté dans cette section, un certain nombre d'études ont rapporté des dysfonctions à ce niveau ainsi qu'au niveau de la structure mitochondriale dans les cœurs insuffisants [103-107]. Par ailleurs, tel que décrit dans la section précédente, il est maintenant bien accepté que les mitochondries jouent un rôle capital dans la survie ou la mort cellulaire par leur capacité à séquestrer ou relâcher un ensemble de facteurs pro-apoptotiques, en réponse à des signaux spécifiques ou à des dommages mitochondriaux. Plusieurs études ont également rapporté une plus grande relâche de ces facteurs et une activation des voies effectrices de la mort cellulaire dans le cœur hypertrophié [108]. Ces indices sont également présentés et discutés.

### **3.2 Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries dans le cœur insuffisant.**

Plusieurs études menées sur des tissus humains, ainsi qu'avec des modèles expérimentaux divers chez l'animal, ont démontré la présence d'une variété d'anomalies mitochondriales dans le cœur insuffisant [103, 104, 106, 107]. Au plan structural, les anomalies sont présentes au niveau des membranes interne et externe, et l'occurrence de mitochondries affichant une réduction de la densité des cristae ou un gonflement de la matrice est augmentée [105, 109].





**Figures 9: Morphologie des cardiomyocytes et des mitochondries dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par le  $\text{TNF}\alpha$ .** Ces micrographies électroniques démontrent que la surexpression de la cytokine  $\text{TNF}\alpha$  (qui est impliquée dans le développement de l'insuffisance cardiaque) dans le cœur de souris induit de profondes altérations morphologiques des mitochondries dans le cœur (images de gauche et du centre) ou les mitochondries isolées (images de droite). (A) souris contrôles, (B) souris transgéniques  $\text{TNF}\alpha$ . Adapté de Ozcan et al 2003.

Outre ces changements structuraux, bon nombre d'études effectuées chez l'Homme et l'animal rapportent également une diminution de l'activité de plusieurs enzymes mitochondriaux mesurée sur le tissu cardiaque entier et sur des préparations de mitochondries isolées [110-115]. Des résultats particulièrement clairs à ce sujet ont été rapportés par Jaretta et al. [112] chez des patients insuffisants atteints de cardiopathies dilatées et ischémiques (Tableau II). De manière similaire, une étude de Buchwald [110], également effectuée chez des patients atteints d'une cardiopathie dilatée a rapporté une diminution significative de l'activité du complexe III ( $3,77 \pm 0,82$  vs  $4,95 \pm 1,15 \mu\text{mol min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) et du complexe IV ( $2,63 \pm 0,96$  vs  $3,65 \pm 0,6 \mu\text{mol min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) de la chaîne respiratoire sur mitochondries isolées.

	IDC (n=17)	IC (n=6)	Controls (n=17)	P-value <sup>b</sup>
Complex I	120±36	133±35	132±61	n.s.
Complex II	286±102 <sup>a</sup>	307±115	392±119	<0.05
Complex III	371±110 <sup>a</sup>	456±110 <sup>a</sup>	703±266	<0.0001
Complex IV	578±202	655±393	589±288	n.s.
Complex I+III	63±40 <sup>a</sup>	73±22 <sup>a</sup>	163±75	<0.0001
Citrate synthase	422±156	416±106	486±127	n.s.

<sup>a</sup>Activity values expressed as nmol/min/mg prot.

<sup>b</sup>ANOVA test for the three groups taken together.

<sup>c</sup>These values were significantly lower than control values in the Student–Newman–Kreuls post-hoc test.

**Tableau II: Activité des complexes de la chaîne respiratoire chez des patients humains atteints de cardiopathies dilatées ou ischémiques.** Le tableau présente l'activité de complexes I, II, III et I+III mesurée dans l'homogénat total obtenu à partir de biopsies effectuées au moment de chirurgie de transplantation cardiaque sur le cœur de patients insuffisants atteints de cardiopathies dilatées (IDC) ou ischémiques (IC). Les valeurs contrôles ont été déterminées sur les mitochondries à partir des cœurs transplantés. Adapté de (Jarreta et al 2000).

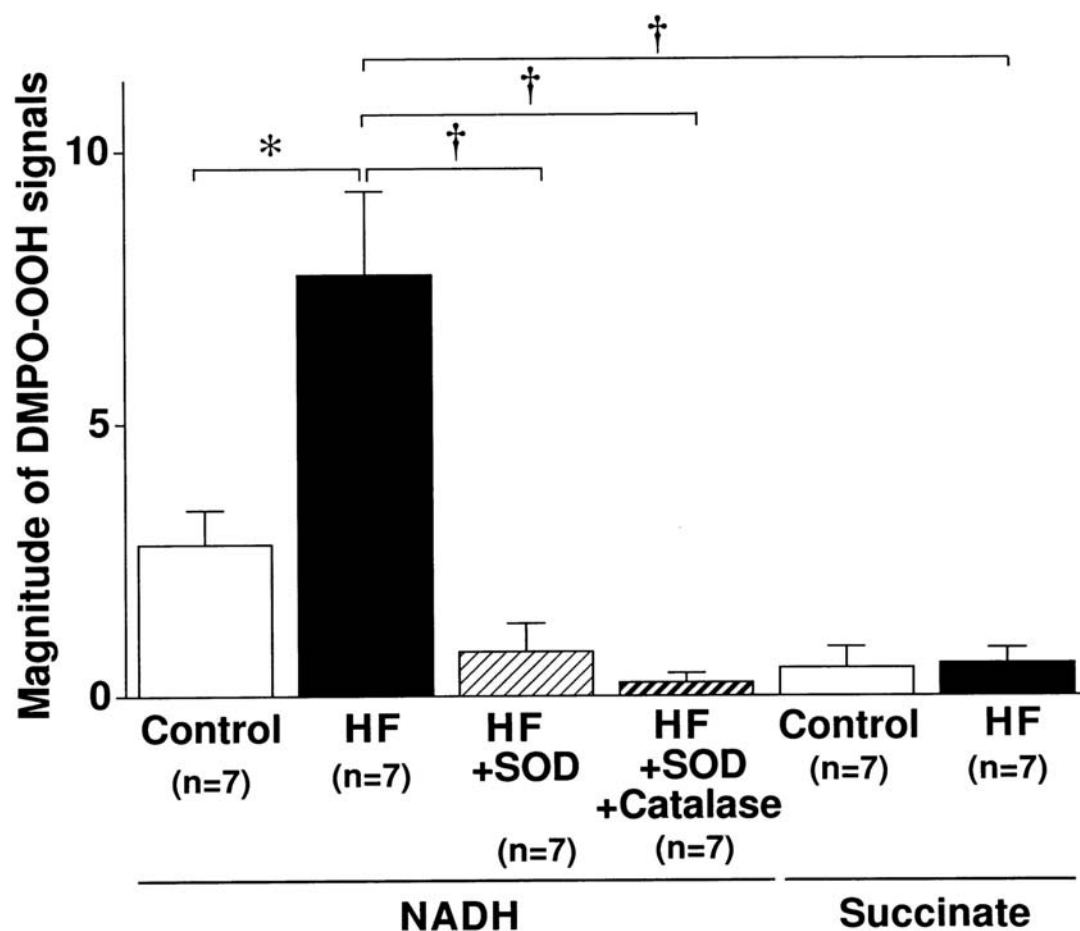
Dans le cœur insuffisant, ces changements enzymologiques apparaissent inévitablement reliés à une diminution de la capacité respiratoire des mitochondries, et ceci en présence d'une variété de substrat énergétique alimentant la chaîne respiratoire à différents niveaux [105, 106, 113, 116, 117] (Tableau III).

**Tableau III: Respiration de mitochondries isolées de coeurs contrôles (SHAM) ou 18 sem post-ligature de l'artère coronaire (CAL)**

Paramètre	Sham	CAL
<i>N</i>	9	9
<i>Citrate synthase (unités/mg protéine)</i>	2,63 ± 0,12	1,97 ± 0,03 **
<i>Respiration (nmol O par min/mg de protéine)</i>		
<b>Stade 2</b>		
2-Oxoglutarate	27 ± 1	25 ± 1
Succinate	69 ± 1	61 ± 1 **
Glutamate	29 ± 2	29 ± 1
<b>Stade 3</b>		
2-Oxoglutarate	235 ± 8	203 ± 8 **
Succinate	169 ± 3	145 ± 6 **
Glutamate	139 ± 4	98 ± 4 **
<i>Ascorbate + TMPD</i>		
2-Oxoglutarate	299 ± 10	264 ± 12 *
Succinate	308 ± 9	283 ± 10
Glutamate	303 ± 9	274 ± 11 *
<b>Stade 3/stade 2 (RCI)</b>		
2-Oxoglutarate	9,0 ± 0,7	8,2 ± 0,5
Succinate	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1
Glutamate	4,8 ± 0,3	3,5 ± 0,2 **
<i>Stade 3/ascorbate</i>		
2-Oxoglutarate	0,79 ± 0,02	0,77 ± 0,02
Succinate	0,55 ± 0,01	0,51 ± 0,01 *
Glutamate	0,46 ± 0,02	0,37 ± 0,01 **

Les résultats représentent la moyenne ± S.E.M. de neuf expériences par groupe. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  groupe CAL vs. groupe sham. Adapté de (Javadov et al 2005).

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté que la production de radicaux libres (ROS) était augmentée dans les mitochondries de cœurs insuffisants [111, 116, 118, 119]. La figure 10, tirée d'une étude de Ide et al. [111] dans laquelle la résonance paramagnétique électronique (ESR) de la sonde hydroxy-TEMPO a été utilisée pour mesurer la production de ROS, démontre bien ce phénomène. Ces auteurs ont observé une augmentation importante du signal TEMPO sur des particules mitochondriales isolées à partir de cœurs insuffisants en présence de NADH, témoignant d'une plus grande production de ROS comparativement aux mitochondries provenant de cœurs contrôles [111]. Ce phénomène était également accompagné d'une plus grande quantité de peroxides lipidiques [111], d'une présence accrue de mutations au niveau de l'ADN mitochondrial [116] et de déficits au niveau de l'activité des complexes I, III et IV [116] dans les cœurs insuffisants comparativement aux cœurs normaux. D'autres études ont confirmé l'augmentation de la fréquence de mutations de l'ADN mitochondrial dans le cœur insuffisant [116, 120-122]. Ce phénomène a été attribué à la production accrue de ROS par la mitochondrie et au fait que cette organelle possède un système de protection et de réparation de l'ADN qui est limité. Ce constat a mené à la suggestion que les mutations de l'ADN mitochondrial pourraient expliquer l'apparition de certaines des anomalies respiratoires décrites précédemment [122]. Bien que ceci soit possible, il a néanmoins été démontré que la présence de mutations de l'ADN mitochondrial n'était pas obligatoire pour observer des déficits dans la production d'ATP mitochondriale [115]. Étant donné qu'une grande majorité des protéines mitochondriales sont encodées dans le génome nucléaire, cette observation semble concevable.



**Figure 10 : Production de radicaux libres par des particules mitochondriales isolées à partir de cœurs normaux et insuffisants.** Les résultats présentent la production de ROS mesurée par résonance paramagnétique électronique du TEMPO sur des particules mitochondriales provenant de cœurs normaux (Control) et de cœurs en insuffisance (HF), à la suite d'un remodelage post-infarctus chez le chien. Les substrats utilisés pour alimenter les complexes respiratoires étaient le NADH (complexe I) et le succinate (complexe II). Le signal TEMPO relié à la production de ROS était significativement inhibé dans les deux groupes expérimentaux en présence de SOD (100 U/mL) ou SOD (100 U/mL) avec catalase (500 U/mL), témoignant de la spécificité du signal TEMPO. La différence entre contrôle et HF est uniquement observée en présence de NADH, suggérant qu'un défaut au niveau du complexe I est responsable. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. \* : Significativement différent des valeurs contrôles ( $p < 0,05$ ); † Significativement différent du groupe HF en présence de succinate ( $p < 0,05$ ). Adapté de (Ide et al 1999).

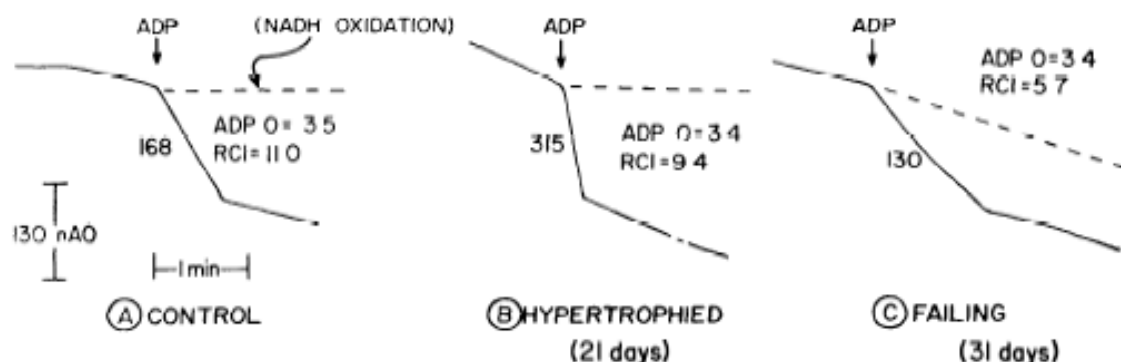
Par ailleurs, au niveau des systèmes de défenses antioxydants, il semble exister une réponse biphasique au cours du remodelage ventriculaire. En effet, quelques études ont rapporté, dans le cœur en phase compensée d'hypertrophie, une augmentation de l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes dont la superoxyde dismutase (SOD), la glutathione peroxydase, et la catalase, ainsi qu'une augmentation du contenu en vitamine E et un rapport glutathione réduit / glutathione oxydé plus élevé [123-125]. Cependant, cette situation s'inverse rapidement pour faire place à une diminution des capacités de défense [123-125]. Ces données ont mené à la suggestion que l'incapacité à contrer l'augmentation du stress oxydant associée au remodelage pathologique, dont une partie est certainement attribuable aux mitochondries, contribuerait à la décompensation cardiaque.

### **3.3 Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries en phase d'hypertrophie compensée.**

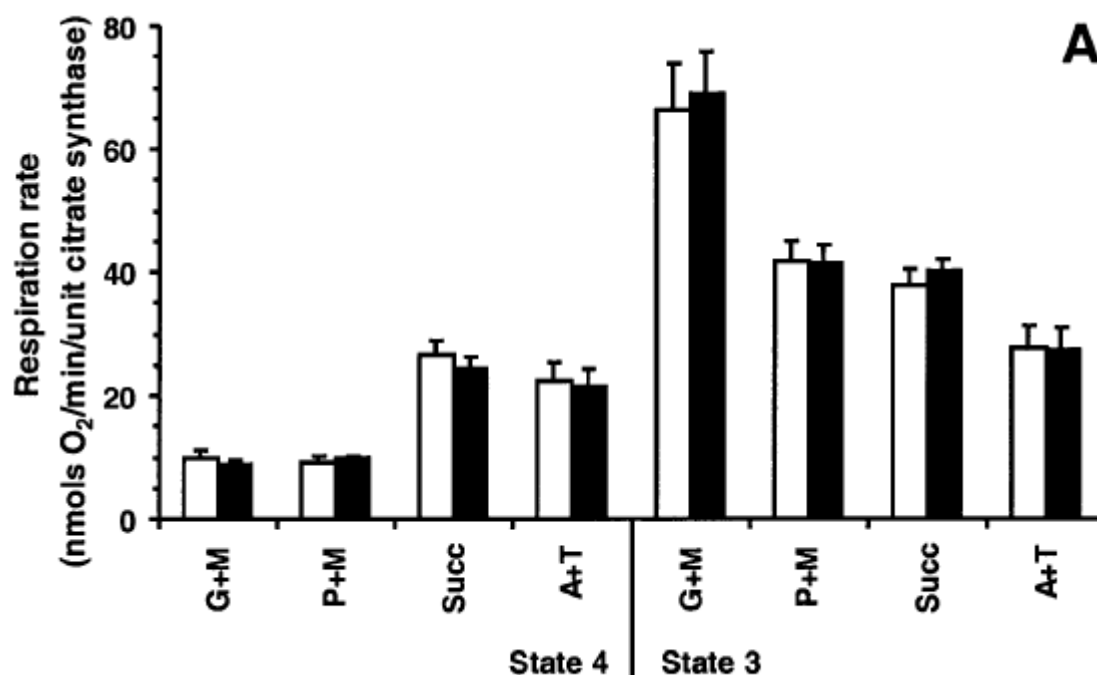
À l'opposé des résultats obtenus dans le cœur insuffisant, la majorité des études qui ont été effectuées à un stade moins avancé de remodelage cardiaque rapportent peu ou pas de dysfonctions mitochondriales. Aucun changement notable de la structure fine des mitochondries ne semble observable [126]. Par ailleurs, une diminution de la surface moyenne des mitochondries au profit d'une augmentation de leur nombre est observée [126]. Cependant, cette modification de l'organisation du réseau mitochondrial n'a pas de conséquence sur le volume des cellules cardiaques occupé par les mitochondries [126].



Au niveau de la fonction respiratoire, l'ensemble des études disponibles suggère une capacité respiratoire normale ou même augmentée dans le cœur hypertrophié [117, 127-131]. La figure 11 tirée d'une étude du groupe de Sordahl [117], dans laquelle un modèle de constriction de l'aorte chez le lapin a été utilisé, démontre clairement ce phénomène. En effet, au stade compensé d'hypertrophie, les mitochondries affichaient une augmentation marquée de la respiration maximale stimulée par l'ADP, comparativement aux mitochondries provenant des cœurs contrôles, alors que les mitochondries provenant de cœurs insuffisants affichaient une nette dysfonction. Par contre, « l'hyperfonction » respiratoire observée en phase compensée n'est pas systématiquement rapportée comme le montre la figure 12, provenant d'une étude de Brookes et al. [131]. Ces auteurs n'ont rapporté aucune modification de la respiration basale et de la respiration stimulée par l'ADP, huit semaines après une constriction de l'aorte abdominale chez le Rat, et ce, en présence de substrats pour les complexes I, II et IV.

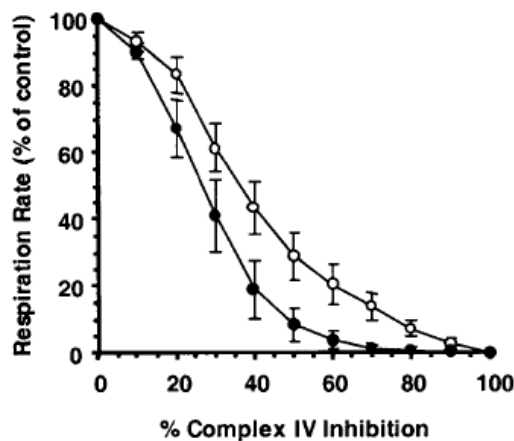


**Figure 11: Fonction respiratoire mesurée sur des mitochondries isolées à partir de cœurs en phase d'hypertrophie compensée et d'insuffisance.** La figure présente des tracés de respiration typiques obtenus sur des mitochondries isolées à partir de cœurs de lapins normaux (A) ou durant la phase d'hypertrophie compensée (B) ou d'insuffisance (C) induite par la constriction de l'aorte. Les mitochondries étaient énergisées avec un mélange de glutamate et de malate. À l'endroit indiqué, de l'ADP était ajouté pour induire la respiration maximale (stade 3), puis la respiration basale (stade 4) obtenue après phosphorylation complète de l'ADP était enregistrée. Les valeurs maximales obtenues en stade 3 sont indiquées à gauche des tracés (en  $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mg}$  protéine). Les rapports ADP : O et RCI (stade 3/stade 4) sont indiqués à droite comme témoins de l'efficacité du couplage entre la respiration et la phosphorylation. La ligne hachurée indique la réponse de la respiration lorsque du NADH exogène était ajouté au lieu de l'ADP. Une augmentation de la respiration en présence de NADH témoigne d'une atteinte à l'intégrité de la membrane interne. Adapté de (Sordahl et al 1973).

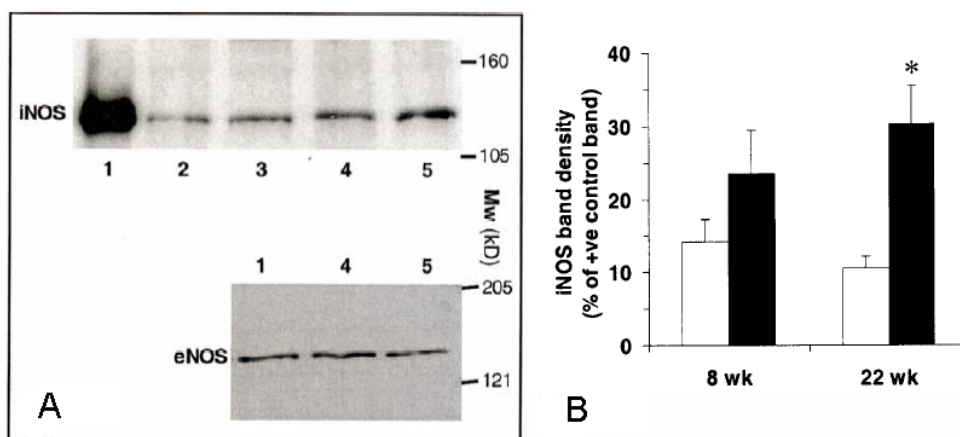


**Figure 12: Propriétés respiratoires de mitochondries isolées à partir de cœurs normaux ou en stade d'hypertrophie compensée à la suite d'une constriction de l'aorte abdominale.** La figure présente la vitesse de respiration évaluée sur des mitochondries isolées à partir de cœurs de rats normaux (□) ou au stade compensé d'hypertrophie secondaire à huit semaines de constriction de l'aorte abdominale (■). Les valeurs moyennes  $\pm$  S.E.M. de la respiration en stade 3 et 4 en présence de glutamate-malate (G+M), pyruvate-malate (P+M), succinate (Succ) et TMPD-ascorbate (A+T) sont présentées (n=5 dans chaque type d'expérience). Adapté de (Brookes et al 2001).

Par ailleurs, malgré l'absence de dysfonctions mitochondriales évidentes au stade compensé d'hypertrophie, il semble néanmoins exister des anomalies subtiles qui peuvent être mises en évidence lorsque les mitochondries sont soumises à des conditions particulières. Par exemple, Brookes et al. [131] ont démontré qu'en dépit de l'absence de modification de la respiration en condition standard d'incubation, les mitochondries provenant de cœurs hypertrophiés étaient significativement plus sensibles à l'oxide nitrique ( $\text{NO}^\bullet$ ) (Figure 13), un facteur de régulation de la respiration exerçant un effet inhibiteur sur le complexe IV [132]. Cette observation est intéressante dans la mesure où l'expression de la  $\text{NO}^\bullet$  synthase (iNOS) est augmentée non seulement dans le cœur insuffisant [133, 134], mais également dans le cœur compensé [134, 135] (Figure 14), suggérant que la respiration mitochondriale pourrait être affectée *in vivo*, même au cours de la phase compensée d'hypertrophie. Cette étude souligne également l'intérêt de soumettre les mitochondries à des contraintes régulatrices ou des perturbations *in vitro* pour mettre en évidence des dysfonctions précoces.



**Figure 13: Effet de l'hypertrophie cardiaque sur la respiration mitochondriale lors d'une inhibition du complexe IV avec  $\text{NO}^\bullet$ .** Les mitochondries ont été isolées à partir du ventricule gauche provenant de rats contrôles (○) et de rats soumis à huit semaines de constriction de l'aorte abdominale (●). La respiration a été titrée avec des concentrations croissantes d'un donneur de  $\text{NO}^\bullet$ . Chaque point représente la moyenne  $\pm$  S.E.M. d'au moins 4 expériences différentes. Adapté de (Brookes et al 2001).



**Figure 14: Effet de l'hypertrophie cardiaque sur l'expression de la NO-synthase.** La figure présente les niveaux d'expression de la NOS inductible (iNOS : 130 KDa) et endothéliale (eNOS : 140 KDa) dans le cœur de Rats normaux ou soumis à une constriction de l'aorte abdominale (BAND). A : Dans les gels représentatifs, les puits contenaient respectivement : 1) les contrôles positifs (des lysats de macrophages de souris pour iNOS et de cellules endothéliales humaines pour eNOS), 2) contrôle huit semaines, 3) BAND huit semaines, 4) contrôle 22 semaines, 5) BAND 22 semaines. B) Analyse densitométrique des résultats obtenus pour l'expression de iNOS (barres blanches : contrôle, barres noires : BAND). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. d'au moins quatre expériences différentes. Adapté de (Brookes et al 2001).

Dans l'ensemble, l'analyse de la littérature disponible démontre donc que la majeure partie des dysfonctions mitochondriales a été observée dans des cœurs ayant déjà atteint l'état d'insuffisance et qu'à l'état compensé de la pathologie, la morphologie et les fonctions basales des mitochondries semblent essentiellement normales [117]. Cette observation a d'ailleurs mené à la question légitime de savoir si les dysfonctions mitochondriales jouent un rôle causal dans la pathogenèse de l'insuffisance ou sont simplement une conséquence tardive. Par ailleurs, il est important de noter que la plupart des études disponibles ont évalué la respiration des mitochondries dans des conditions optimales bien définies qui ne reproduisent pas les contraintes ou les influences régulatrices rencontrées au niveau de l'organe entier. Les études de Brookes et al. [131] sur la réponse respiratoire au NO<sup>•</sup> démontrent clairement l'existence de réponses anormales à des régulateurs qui peuvent avoir des répercussions *in vivo*.

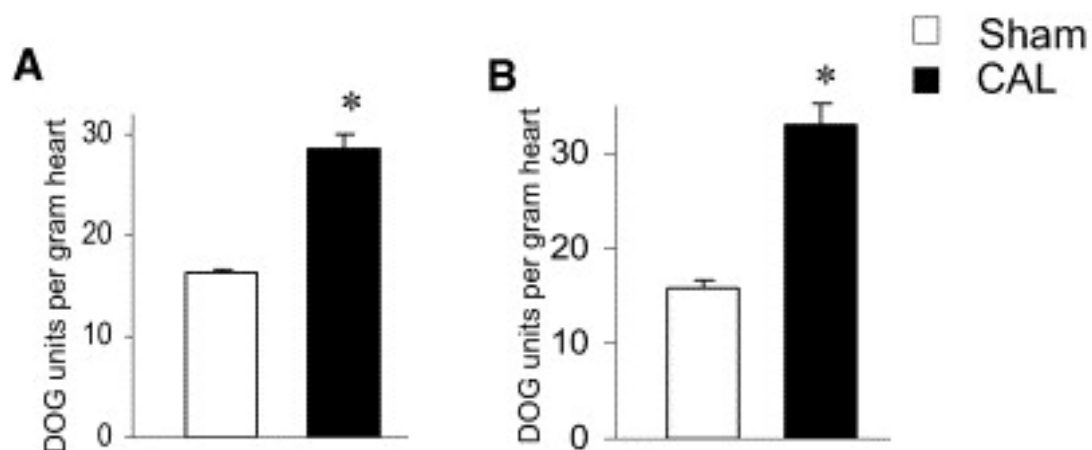
### **3.4 Activation des mécanismes mitochondriaux de mort cellulaire dans le cœur insuffisant.**

Plusieurs études chez l'Homme et avec divers modèles expérimentaux chez l'animal ont rapporté la présence de plusieurs formes de mort cellulaire dans le myocarde insuffisant. L'examen histologique de tissu cardiaque humain révèle la présence de cellules nécrotiques, présumément à la suite d'ischémies focales ou d'un processus inflammatoire chronique [136, 137]. Plusieurs études ont également rapporté la présence accrue de plusieurs marqueurs de mort cellulaire apoptotique, telles la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN génomique par

marquage TUNEL [108, 114, 138-140]. Finalement, des études récentes démontrent également que l'autophagie est activée dans le cœur insuffisant, quoique le rôle de ce processus dans la mort cellulaire programmée ne soit pas encore bien défini [136, 137].

Bien que plusieurs mécanismes puissent entraîner la mort cellulaire, certains indices expérimentaux suggèrent que les mitochondries jouent un rôle. En effet, une augmentation de la relâche de cytochrome c [139, 141], ainsi qu'une activation des caspases 9 [141] et 3 [138, 139], ont été rapportées dans des échantillons de tissu cardiaque provenant de patients humains ou d'animaux en insuffisance. Les mécanismes menant à la relâche de facteurs apoptotiques par les mitochondries sont encore relativement mal définis. Quelques études ont associé cette relâche à une augmentation de l'expression de Bax et une diminution de l'expression de Bcl-2 [138, 140, 142]. Ceci aurait pour effet possible la formation d'oligomères Bax/Bak dans la membrane mitochondriale externe et la relâche subséquente des facteurs pro-apoptotiques situés dans l'espace inter-membranaire. Par ailleurs, étant donné que Bax et Bcl-2 influencent également l'ouverture du PTP (voir section 2.3.2.1), il est possible que ce mécanisme de perméabilisation membranaire joue également un rôle.

À cet égard, une étude du groupe de Karmazyn [113] a démontré que l'occurrence d'ouverture du PTP était augmentée dans le cœur insuffisant (Figure 15).



**Figure 15: Ouverture du PTP représentée en unité DOG dans les mitochondries cardiaques isolées de rats de 12 sem (A) et 18 sem (B) après une ligature d’une artère coronaire (CAL) ou non (Sham).** Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  S.E.M. de huit à neuf animaux par groupe. \* Significativement différent entre le groupe CAL et Sham ( $P < 0,01$ ) (adapté de Javadov et al 2005).



En effet, ces auteurs ont démontré que l'ouverture du PTP mesuré *in situ* par la technique du [ $^3\text{H}$ ]-DOG était augmentée après douze semaines de remodelage induit par ligature d'une artère coronaire. Ce phénomène a été observé dans des cœurs bien perfusés et oxygénés, suggérant que l'ouverture du PTP est un processus en cours à ce stade de la pathologie. Cette observation est compatible avec les données rapportées chez des souris transgéniques surexprimant de manière cardio-spécifique le  $\text{TNF}\alpha$ , une cytokine impliquée dans l'insuffisance cardiaque [105]. En effet, la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  requise pour induire l'ouverture du PTP *in vitro* sur mitochondries isolées était significativement diminuée chez ces souris comparativement aux souris contrôles. Il est par ailleurs important de remarquer que dans ces deux études, les mitochondries affichaient également d'importantes dysfonctions respiratoires étant donné l'état avancé de la pathologie. Il est donc possible que l'ouverture du PTP observée soit une simple conséquence d'atteintes mitochondriales sévères et joue un rôle limité dans le développement de l'insuffisance cardiaque. Fait notoire cependant, l'étude du groupe de Karmazyn [113] a également démontré que l'effet bénéfique de l'inhibition chronique de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  avec le EMD87580 sur le remodelage ventriculaire était associé à une inhibition de l'ouverture du PTP. Cependant, puisque l'inhibition des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est susceptible d'exercer d'autres effets bénéfiques, il n'est pas clair que l'inhibition du PTP soit le mécanisme responsable des bénéfices au niveau du remodelage.

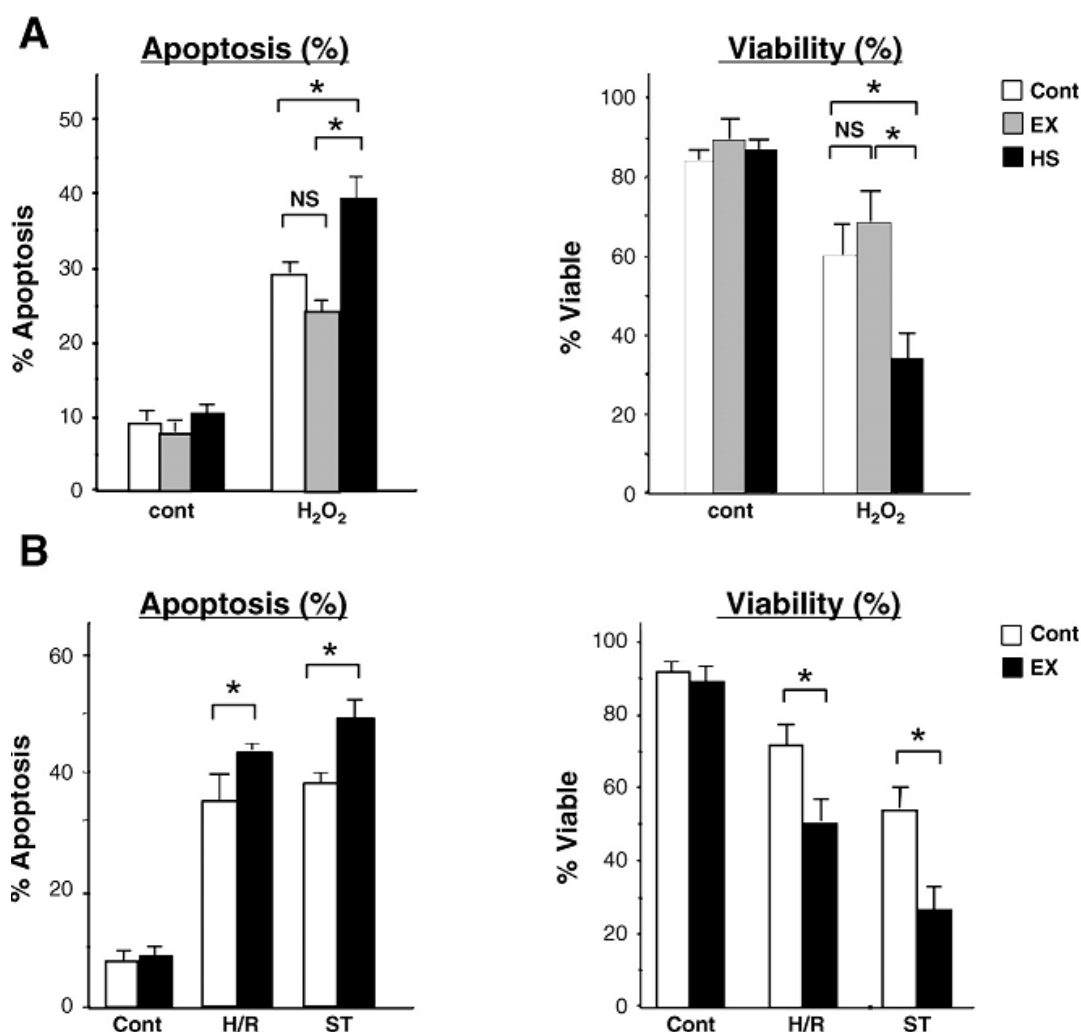
Globalement, les données disponibles indiquent donc que l'atteinte de l'insuffisance cardiaque s'accompagne d'une activation substantielle et soutenue de la

mort cellulaire qui est au moins en partie causée par des dysfonctions mitochondriales, des processus de perméabilisation membranaire impliquant certaines protéines de la famille des Bcl-2 et le PTP. Cependant, puisque ces phénomènes ont pour la plupart été observés dans le cœur insuffisant, leur rôle causal dans le développement de la pathologie n'est pas encore clairement établi. L'identification de dysfonctions mitochondriales précoces lors de la phase compensée du remodelage contribuerait à répondre à cette question et éventuellement à cibler des actions visant à leur prévention.

### **3.5 La vulnérabilité au stress : un contributeur potentiel à la transition vers l'insuffisance cardiaque.**

Les dysfonctions systoliques, une fois présentes à la suite d'un événement ayant déclenché le remodelage ventriculaire, se détériorent fréquemment de manière progressive sur une période allant de plusieurs mois à plusieurs années, avant de précipiter la décompensation cardiaque. De ce fait, pendant la période compensée du remodelage ventriculaire, les cardiomyocytes sont vraisemblablement soumis à des périodes prolongées de stress, allant des hypoxies ou ischémies régionales transitoires, aux réponses inflammatoires, en passant par le stress oxydant et les déséquilibres de l'homéostasie calcique. Un concept récemment mis de l'avant est que la progression de l'hypertrophie compensée vers l'insuffisance cardiaque soit en partie causée par une plus grande vulnérabilité des cardiomyocytes aux stress induisant la mort cellulaire [108]. Dans cette étude, les auteurs ont évalué la vulnérabilité des cardiomyocytes à une variété de stress *in vitro* chez des rats Dahl (une souche de rat affichant une hypertension chronique et un remodelage

ventriculaire en réponse à une diète salée), durant la période compensée et décompensée de la pathologie. Ils ont démontré que durant la phase compensée, les cardiomyocytes hypertrophiés affichaient un plus grand pourcentage de mort cellulaire à la suite d'une ischémie-réperfusion simulée, un stress oxydant induit par incubation en présence de  $H_2O_2$  ou une exposition à la staurosporine (Figure 16).



**Figure 16: Effet du remodelage ventriculaire hypertrophique sur la vulnérabilité des cardiomyocytes au stress *in vitro*.** Cette figure présente le pourcentage de cellules apoptotiques et la viabilité cellulaire en absence ou présence de stress *in vitro*, incluant l'incubation en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'ischémie-réperfusion simulée (6-18 heures respectivement) et un traitement avec la staurosporine. Les tests ont été effectués sur des myocytes obtenus à partir de cœurs normaux (Cont), hypertrophiés à la suite d'un entraînement (EX) ou hypertrophiés par surcharge pressive (HS). Le modèle d'hypertension utilisé était le Rat Dahl, une souche développant une hypertension spontanée en réponse à une diète salée. Les rats contrôles et entraînés étaient de la même souche, mais n'ont pas été soumis à la diète hypertensive. Les cardiomyocytes provenant des cœurs en hypertrophie pathologique compensée (HS) sont plus vulnérables aux trois formes de stress imposées. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6$  dans chaque condition). NS : non significatif; \* : significativement différent de contrôle ( $P < 0,05$ ). Adapté de (Kang et al. 2004).

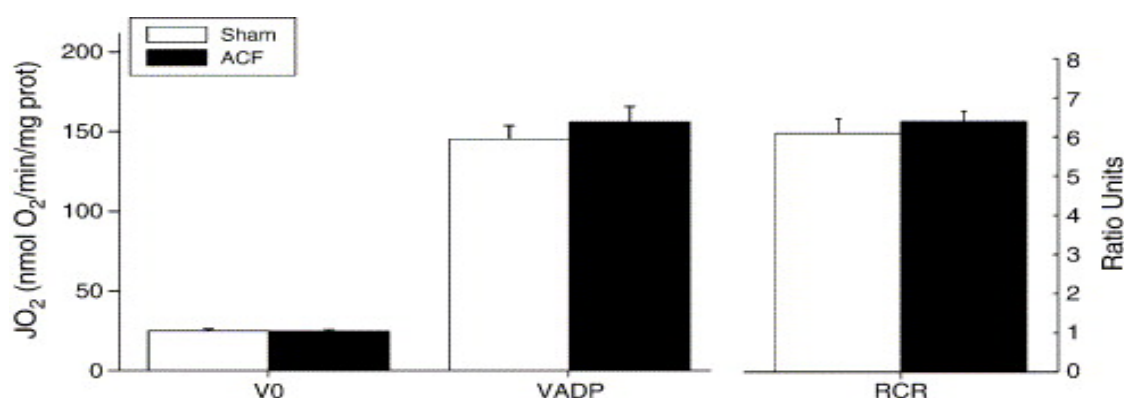
La plus grande vulnérabilité à l'ischémie-réperfusion en état d'hypertrophie compensée a également été rapportée dans plusieurs études menées sur le cœur entier perfusé *ex vivo* [143-145]. Fait notable, l'étude menée chez les rats Dahl par Izumo et al. [108] a également démontré que les indices histologiques témoignant d'une augmentation de la mort cellulaire *in vivo*, au niveau de l'organe entier, étaient observables dans le cœur insuffisant mais indécélables au cours du stade compensé, suggérant que la vulnérabilité au stress durant le stade compensé est un événement précoce qui pourrait jouer un rôle causal.

Étant donné que la mort cellulaire induite par l'ischémie-réperfusion [49, 146, 147] comme le stress-oxydant [148-151] est causée, entre autres, par l'ouverture du PTP, notre laboratoire a émis l'hypothèse qu'au cours de la phase compensée d'hypertrophie, une augmentation de la vulnérabilité des mitochondries aux stress causant l'ouverture du PTP pourrait donc contribuer aux dysfonctions contractiles et à la mort cellulaire qui a été rapportée lorsque le cœur est soumis à un stress.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle d'hypertrophie pathologique induite par une fistule aorto-cavale (ACF) chez le Rat WKHA. Cette souche de rat qui présente une masse cardiaque augmentée à la base et une susceptibilité au remodelage en réponse aux surcharges, a été utilisée dans le laboratoire de notre collègue le Dr. Christian Deschepper pour étudier les gènes reliés à l'hypertrophie cardiaque [152]. Des études antérieures provenant de ce laboratoire ont démontré que chez le rat WKHA, une hypertrophie compensée est

systématiquement observable 12 semaines après induction de la surcharge volumique par ACF [152]. Nous avons donc isolé les mitochondries de rats contrôles et ACF à ce moment pour caractériser leur fonction basale et leur susceptibilité au stress *in vitro*.

Comme le démontrent la figure 17 et le tableau IV, aucune différence entre le groupe contrôle et ACF n'a été observée au niveau de la respiration basale ( $V_0$ ) et stimulée par l'ADP ( $V_{ADP}$ ), en présence de substrats énergétiques alimentant le complexe I ainsi que l'activité de différents complexes de la chaîne respiratoire. De plus, le potentiel de membrane mesuré en condition basale était similaire chez les contrôles et les ACF. Par contre, la dysfonction respiratoire induite par une période d'anoxie-réoxygénation (A-R) était significativement plus importante dans les mitochondries ACF, comparativement aux mitochondries contrôles (Figure 18). Fait notable, la présence de CsA durant la période d'A-R a permis d'abolir la différence entre les deux groupes expérimentaux, suggérant clairement que l'ouverture du PTP était responsable de l'augmentation de la dysfonction respiratoire chez les ACF.

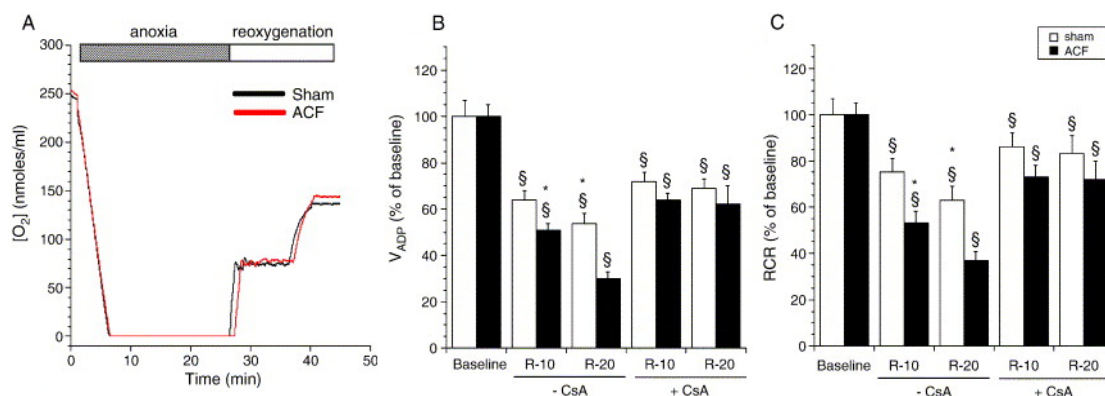


**Figure 17: Effet de la surcharge volumique sur la fonction basale de mitochondries cardiaques.** La figure présente la respiration basale en absence d'ADP ( $V_0$ ), la respiration maximale en présence de 1 mM ADP ( $V_{ADP}$ ), ainsi que le ratio RCR ( $V_{ADP}/V_0$ ) mesuré sur des mitochondries cardiaques isolées 12 semaines après une chirurgie sham ou une fistule aorto-cavale (ACF). Les mitochondries étaient énergisées avec un mélange glutamate-malate (5:2.5 mM). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ S.E.M. pour un  $n = 12$  dans chaque groupe. Adapté de (Marcil et al 2006).

**Tableau IV: Activité des enzymes mitochondriales chez les rats sham et ACF.**

	Sham (mU/mg protéine)	ACF (mU/mg protéine)
NADH-ubiquinone oxydoréductase (complexe I)	$0,63 \pm 0,07$	$0,53 \pm 0,05$
Succinate-ubiquinone réductase (complexe II)	$0,34 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,03$
Cytochrome c oxydase (complexe IV)	$1,99 \pm 0,12$	$2,15 \pm 0,14$
NADH-cytochrome c oxydoréductase roténone sensible (complexes I+III)	$0,19 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,02$
Citrate synthase	$0,78 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,04$

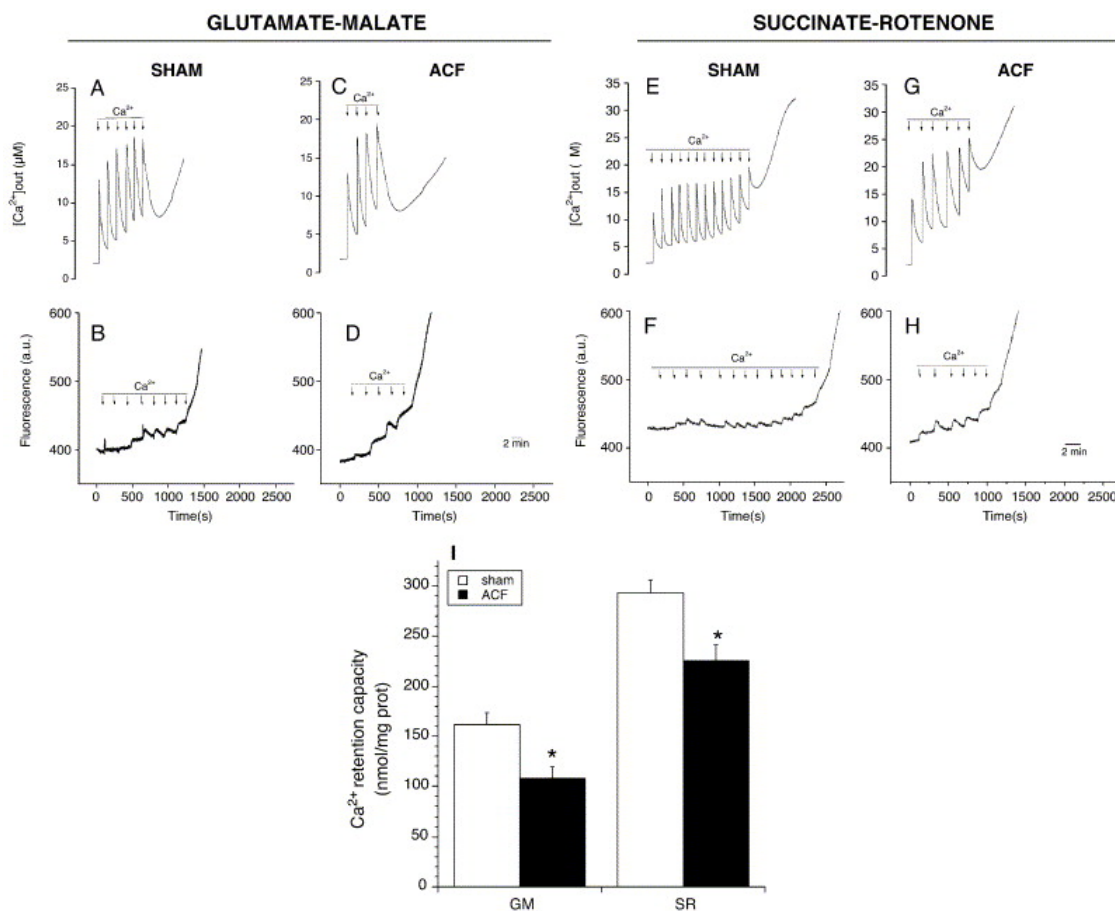
Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. de six animaux dans chacun des groupes.



**Figure 18: Effet de la surcharge volumique sur la dysfonction respiratoire induite par une anoxie-réoxygénation *in vitro*.** La figure A présente un enregistrement typique de la concentration en O<sub>2</sub> durant une anoxie-réoxygénation avec des mitochondries provenant d'animaux sham et ACF. Les valeurs obtenues pour V<sub>ADP</sub> et le RCR à la 10<sup>e</sup> et la 20<sup>e</sup> minute de réoxygénation (figures B et C) sont exprimées en pourcentage des valeurs observées en absence d'anoxie-reoxygénation (Baseline). Les expériences ont été répétées en absence ou présence de 1 µM de cyclosporine A (CsA) ajoutée avant l'anoxie. Les valeurs représentent la moyenne ± S.E.M. pour un  $n = 12$  dans chaque groupe. §: significativement différent de pré-anoxie dans le même groupe expérimental, ( $p < 0,01$ ), \*: significativement différent du groupe sham dans les mêmes conditions expérimentales, ( $p < 0,01$ ). Adapté de (Marcil et al 2006).

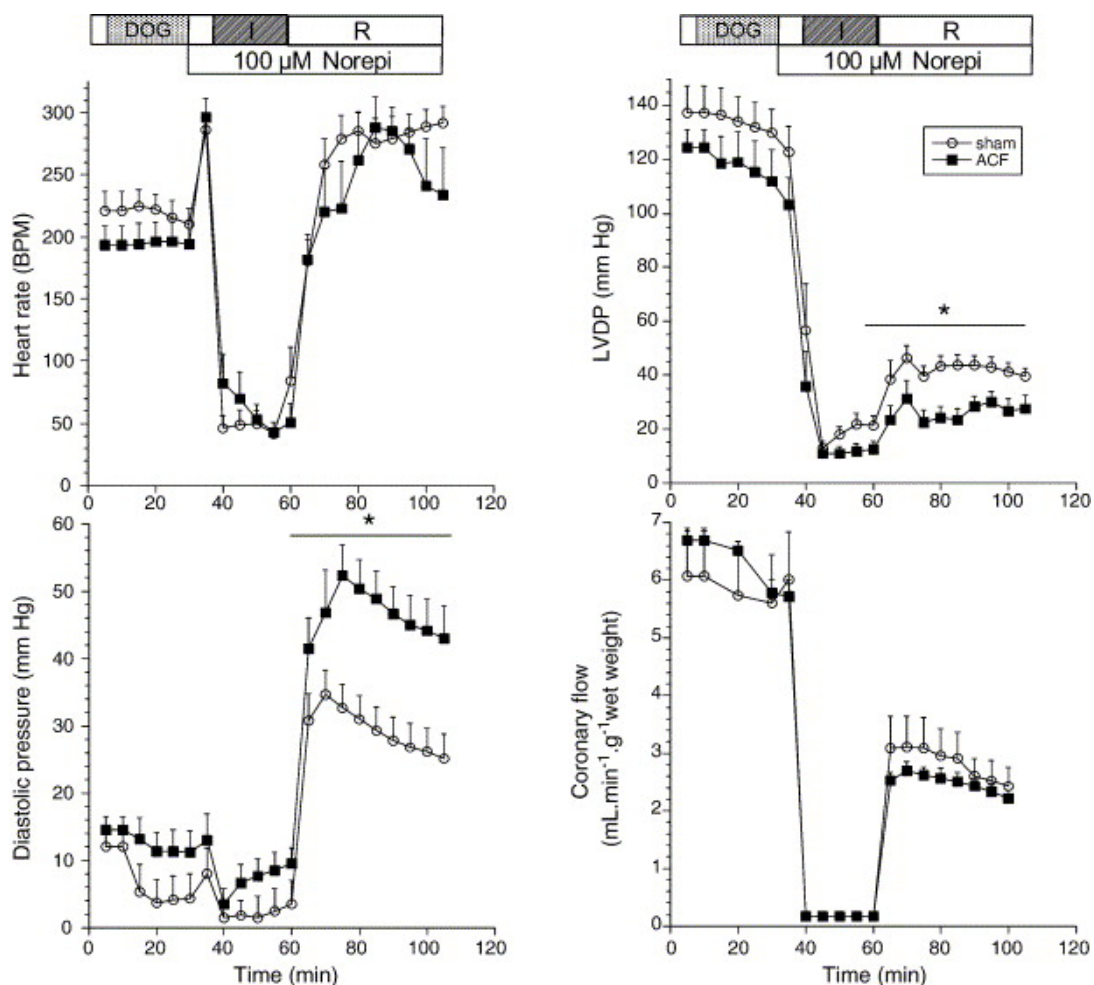


De manière à confirmer la plus grande vulnérabilité des mitochondries ACF à l'ouverture du PTP, des tests de surcharge calcique ont été effectués compte tenu que le  $\text{Ca}^{2+}$  est l'inducteur obligatoire du PTP (Figure 19). Ce test consiste à soumettre les mitochondries à des ajouts successifs de  $\text{Ca}^{2+}$  et à déterminer la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  que peuvent accumuler les mitochondries avant de déclencher l'ouverture du PTP. L'ouverture du PTP est caractérisée par la relâche du  $\text{Ca}^{2+}$  accumulé (mesuré à l'aide de la sonde fluorescence Calcium-Green) et l'abolition du potentiel de membrane (mesuré en parallèle avec la sonde fluorescente Rhodamine 123). Ces expériences ont démontré que la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  requise pour induire l'ouverture du PTP était significativement inférieure dans les mitochondries ACF comparativement aux mitochondries contrôles, peu importe le substrat respiratoire utilisé.

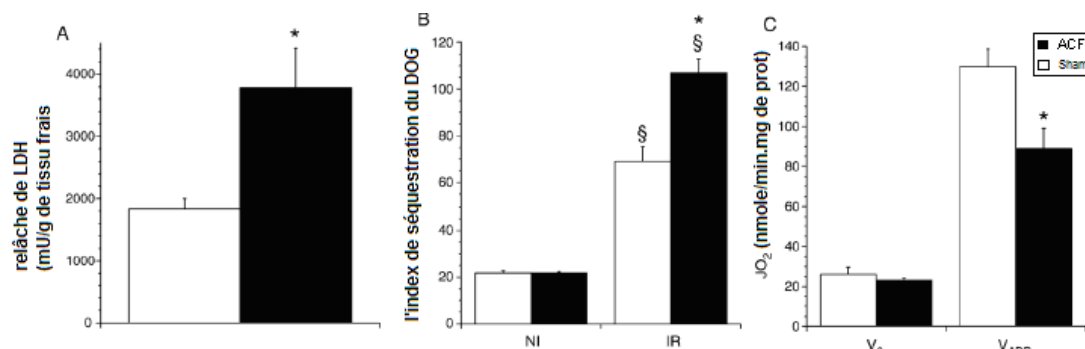


**Figure 19: Effet de la surcharge volumique sur la vulnérabilité à l'ouverture du PTP induite par surcharge calcique.** La figure des cinétiques typiques de prise et de relâche du  $\text{Ca}^{2+}$  (A, C, E et G) et du potentiel de membrane (B, D, F et H) obtenues sur les mitochondries sham et ACF énergisées, soit avec du glutamate-malate (GM: 5:2.5 mM), soit du succinate (SR: 5 mM), en présence de 1  $\mu\text{M}$  de roténone. Les tracés montrent l'accumulation progressive de  $\text{Ca}^{2+}$  suivie par sa relâche et l'effondrement simultané du potentiel de membrane. Chaque flèche indique l'addition d'une dose de calcium de 42 nmol/mg protéine. La figure I présente la capacité de rétention calcique (CRC) calculée à partir de huit à dix expériences différentes dans chaque groupe. \*: Significativement différent des sham, ( $p < 0,05$ ). Adapté de (Marcil et al 2006).

Nous avons également soumis les cœurs de rats sham et ACF à un protocole d'I-R *ex vivo* dans le but d'évaluer leur réponse fonctionnelle et de quantifier l'ouverture du PTP et ses conséquences dans l'organe entier. Nous avons démontré que, comparativement aux cœurs de rats sham, les cœurs de rats ACF affichaient une moins bonne récupération fonctionnelle (Figure 20) et une perte d'intégrité cellulaire (telle qu'évaluée par la relâche de LDH) (Figure 21), tandis que les mitochondries isolées à la fin de la reperfusion affichaient des fonctions respiratoires réduites ainsi qu'une augmentation de l'ouverture du PTP (Figure 21). Nous avons également montré que l'ouverture accrue du PTP dans les cœurs ACF était associée à une plus grande relâche de cytochrome c et de Smac/Diablo dans le cytosol (Figure 22), suggérant une activation accrue de la voie mitochondriale de la mort cellulaire.

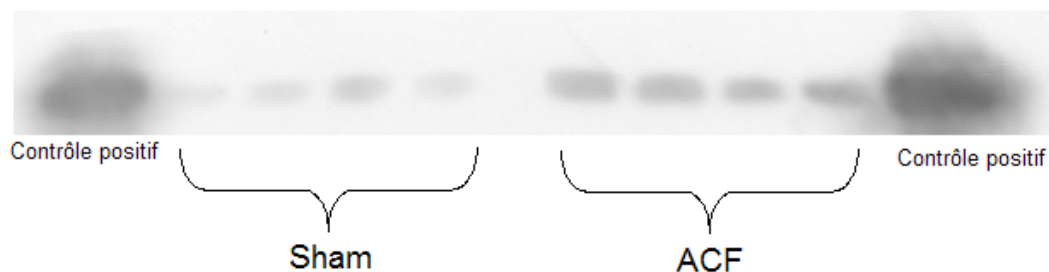


**Figure 20: Réponse du myocarde à une ischémie-réperfusion *ex vivo* chez des animaux Sham et ACF.** La figure montre l'évolution de la fréquence cardiaque (BPM), la pression développée par le ventricule gauche (LVDP), la pression diastolique et du débit coronarien chez des cœurs Sham et ACF soumis à une ischémie à faible débit (3% du débit coronaire préischémique), avec présence d'un stress adrénergique (100 μM noradrénaline). Par souci de clarté, les valeurs obtenues pour les cœurs qui n'ont pas été soumis à une I-R (n=4 dans chacun des groupes) et qui ont servi à déterminer les valeurs basales de distribution du [<sup>3</sup>H]-DOG ne sont pas représentées. Après une période initiale de dix minutes de stabilisation, les cœurs sont perfusés avec le tampon KH contenant du [<sup>3</sup>H]-DOG tel qu'indiqué. Cinq minutes avant l'ischémie, le cœur est perfusé avec du tampon KH sans radioactivité pour éliminer le [<sup>3</sup>H]-DOG extracellulaire. Durant cette phase, l'infusion de norépinéphrine (100μM) est amorcée et maintenue pour le reste de la perfusion. La LVDP est calculée par différence entre les pressions systolique et diastolique. \* : Significativement différent des Sham, p<0,05.



**Figure 21 : Relâche de LDH, séquestration mitochondriale du [ $^3\text{H}$ ]-DOG et mesure de la fonction respiratoire sur mitochondries isolées postréperfusion dans les groupes Sham et ACF.** La figure A présente l'aire sous la courbe de la relâche de LDH dans le perfusat durant la réperfusion. La relâche de LDH est calculée en multipliant la valeur du débit (en mL/min/g de tissu frais) par la concentration en LDH (en mU/min/g de tissu frais). La figure B montre l'index de séquestration du [ $^3\text{H}$ ]-DOG exprimé comme le ratio DPM de la fraction mitochondriale/DPM du tissu (voir méthodologie pour plus de détails) chez les cœurs n'ayant pas subi d'ischémie (NI) (n=4 dans chaque groupe) et chez les cœurs ayant subi une I-R (n=9 et n=8 pour Sham et ACF). La figure C montre la respiration basale ( $V_0$ ) et la respiration maximale stimulée par l'ADP ( $V_{ADP}$ ) mesurée sur les mitochondries isolées à l'issue de la perfusion.

#### A) cytochrome c



#### B) Smac/Diablo



**Figure 22: Relâche de cytochrome c et de Smac/Diablo dans le cytosol lors d'une ischémie réperfusion sur des cœurs d'animaux Sham (n=4) et ACF (n=4).**

Lors d'études ultérieures, nous avons tenté d'identifier le ou les mécanismes impliqués dans cette sensibilité mitochondriale [153]. Nous avons mesuré l'abondance et la localisation de la cyclophiline-D (CypD), un régulateur de l'ouverture du PTP, ainsi que la production de ROS par la chaîne respiratoire. La quantité de CypD dans la fraction mitochondriale totale était augmentée de 80% dans le groupe ACF, comparativement au groupe Sham. De plus, la quantité de CypD retrouvée dans la portion membranaire de la fraction mitochondriale était 3,7 fois plus importante chez les ACF que chez les Sham. Par ailleurs, les mitochondries des animaux ACF produisaient plus de ROS que celles des animaux Sham. De manière intéressante, nous avons également démontré que la translocation de la CypD à la fraction membranaire était favorisée par le stress oxydant. En effet, l'incubation de mitochondries avec des concentrations croissantes de *terbutylhydroperoxyde in vitro* était associée à une augmentation dose dépendante du recrutement membranaire de la CypD et une sensibilisation à l'ouverture du PTP. Globalement, les résultats de cette étude nous ont donc amenés à formuler l'hypothèse que l'augmentation de l'abondance de CypD et sa translocation à la membrane mitochondriale, possiblement via une production de ROS accrue, pourraient expliquer au moins en partie la vulnérabilité mitochondriale au stress chez les rats WKHA soumis à un ACF [153].

Pris dans leur ensemble les résultats de nos expériences ont fourni la première démonstration que dans les cœurs en remodelage ventriculaire pathologique, une vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP se développe au cours de la phase

compensée d'hypertrophie alors que les mitochondries ne présentent aucune dysfonction respiratoire évidente à l'état basal. Ce phénomène a été observé *in vitro* sur des mitochondries isolées et *in situ* dans le cœur entier perfusé. Nous pensons que ce phénomène pourrait jouer un rôle dans la progression vers la décompensation cardiaque. En effet, les cardiomyocytes d'un cœur hypertrophié sont exposés de manière chronique à des stress qui favorisent l'ouverture du PTP telles qu'une augmentation de la production de radicaux libres [101, 154, 155], une modification de l'homéostasie calcique [156, 157], et des ischémies transitoires partielles [101, 105]. L'incapacité de certaines mitochondries à tolérer ces stress pourrait déclencher l'ouverture du PTP, l'activation de la mort cellulaire et la perte de myocytes cardiaques. Ceci pourrait engendrer un cercle vicieux augmentant sans cesse le niveau de stress infligé au cardiomyocytes, menant ainsi à la décompensation cardiaque.

Bien que les résultats obtenus dans ces deux études [1, 153] aient clairement démontré la présence d'une vulnérabilité précoce à l'ouverture du PTP, elles n'ont pas permis d'établir un lien causal avec la progression vers l'insuffisance cardiaque. L'objectif de la première étude de cette thèse était donc d'établir ce lien, en comparant deux souches de rats affichant des prédispositions génétiques très différentes au développement de l'insuffisance cardiaque en réponse à l'ACF : 1) la souche WKHA qui est résistante et n'affiche qu'une mortalité de 18% avant 39 semaines post-chirurgie et 2) la souche Sprague-Dawley (SD) qui est susceptible et affiche une mortalité de 64% sur la même période. Plus spécifiquement nous avons déterminé *a)* si la vulnérabilité mitochondriale au stress se développait plus tôt chez

les animaux progressant plus rapidement vers l'insuffisance (*i.e.* chez les rats SD vs les WKHA) et **b)** si la vulnérabilité mitochondriale observée dans la phase précoce du remodelage progressait vers les dysfonctions mitochondriales plus sévères avec l'avancement de la pathologie.

#### **4 LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE**

Une autre question d'importance sur laquelle nous nous sommes penchés est celle de déterminer si la vulnérabilité mitochondriale précoce est un phénomène observable dans d'autres cardiopathies présentant des étiologies différentes de celle de la surcharge volumique. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), une maladie génétique causée par la mutation de la protéine cytosquelettique dystrophine. En effet, tel qu'élaboré dans cette section, le développement progressif de cardiomyopathie survient fréquemment chez les patients DMD et constitue une cause importante de mortalité. Par ailleurs, chez la souris *mdx*, le modèle murin de la DMD, le cœur présente une vulnérabilité précoce au stress dès le jeune âge en absence de cardiomyopathie, ce qui fait penser dans une certaine mesure aux observations que nous avons faites dans le modèle ACF chez le Rat. Finalement, bien que la pathogenèse ne soit pas encore très bien comprise, il existe des évidences dans la littérature suggérant que les mitochondries, puissent être impliquées [6-8, 124, 169].



#### **4.1 Cardiomyopathie reliée à la dystrophine**

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), qui doit son nom à Guillaume Duchenne qui en fit la description en 1858, est la dystrophie la plus fréquente et touche un nouveau-né mâle sur 3 500 [158]. La DMD est due à une mutation dans le gène de la dystrophine, une protéine de 427 kD codée dans le chromosome X jouant un rôle clé dans le complexe dystroglycan liant le cytosquelette à la matrice extra cellulaire. L'absence de dystrophine fonctionnelle dans le muscle strié provoque une fragilité cellulaire, particulièrement au stress mécanique, et augmente ainsi la perméabilité membranaire. Les muscles squelettiques, qui sont les premiers touchés chez ces patients, présentent une dégénérescence progressive au cours de laquelle les fibres musculaires endommagées, incapables de se réparer adéquatement, sont graduellement remplacées par du tissu conjonctif et des dépôts lipidiques [159]. Ultimement, ce phénomène entraîne une faiblesse musculaire forçant les patients à recourir à la chaise roulante vers l'âge de dix à douze ans [159]. La plupart des patients atteints de DMD développent à plus long terme une cardiomyopathie dilatée qui est responsable de 20 % des mortalités, vers l'âge de 20-30 ans [158]. Cette cardiopathie est également observée dans la dystrophie musculaire de Becker (BMD), une forme plus bénigne de la DMD, ainsi que dans d'autres cardiomyopathies liées au chromosome X [158]. Dans ces trois pathologies, le cœur est affecté à divers degrés selon le stade de la maladie et le type de mutation. Au plan patho-anatomique, la cardiomyopathie, tout comme dans le muscle squelettique, se caractérise par l'apparition de lésions nécrotiques focales et le remplacement progressif du tissu myocardique par du tissu conjonctif et des dépôts lipidiques. Dans la DMD/BMD le

ventricule gauche est le plus affecté, épargnant le ventricule droit et les oreillettes. Cliniquement, les patients DMD présentent initialement des anomalies à l'ECG auxquelles s'ajoutent progressivement une dysfonction ventriculaire et des arythmies, l'ensemble culminant éventuellement en une défaillance cardiaque [158].

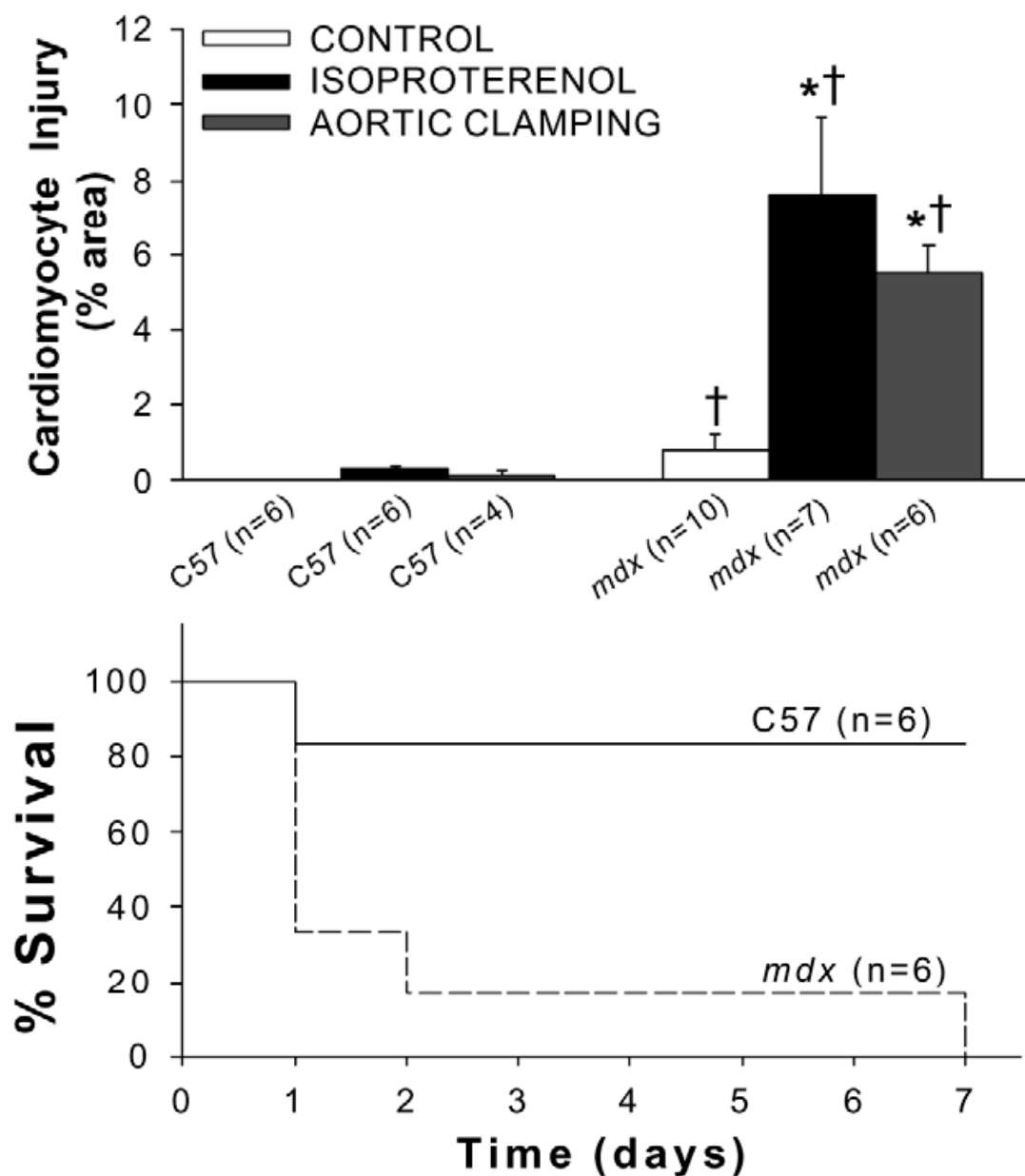
De façon intéressante, la souris *mdx* présente une progression pathologique très similaire à celle qui est observée chez l'Homme. Les animaux développent notamment une cardiomyopathie au cours du vieillissement [158]. Les évidences électrophysiologiques et histologiques de la pathologie apparaissent typiquement vers vingt-cinq à trente semaines d'âge. [160]. Vers la quarantième semaine, les animaux présentent une franche fibrose du ventricule gauche, une dilatation cardiaque ainsi qu'une détérioration des fonctions contractiles qui continue de se dégrader jusqu'au décès [160-162].

#### **4.2 Vulnérabilité du tissu musculaire au stress**

Dans le muscle squelettique, la susceptibilité au dommage induit par le stress mécanique, particulièrement lors de contractions excentriques, est reconnue comme un facteur initiateur de la pathologie [163]. À titre d'exemple, Weller et al. [163] ont rapporté que, chez la souris *mdx*, le muscle tibialis antérieur réagissait positivement pour les immunoglobulines G (un indice de nécrose aiguë), comparativement aux fibres de muscles normaux, lorsque soumis à un protocole de contractions excentriques *in vivo*. Par ailleurs, d'autres études, portant sur la capacité de diverses molécules à diffuser, soit vers l'extérieur [164, 165] ou l'intérieur [166] des fibres

musculaires, ont de façon générale rapporté une plus grande perméabilité du sarcolemme postexercice chez la souris *mdx*.

De la même manière, plusieurs études ont démontré que l'augmentation du travail cardiaque accélérerait le développement de la cardiomyopathie chez la souris *mdx* [10, 167, 168]. En effet, i) la course sur tapis roulant [167], ii) l'administration aiguë *in vivo* d'un  $\beta$ -adrénergique [169], iii) la perfusion cardiaque *ex vivo* en mode travaillant [7, 169], et iv) la surcharge pressive induite par la constriction aortique [10, 168] ont été associées à un accroissement des lésions sarcolemmales et, dans certains cas, à une mortalité accrue chez les souris *mdx* comparativement aux souris contrôles. Fait notable, cette vulnérabilité au stress a de manière générale été observée chez de jeunes souris (*i.e.* âgées de moins de 16 semaines), en absence de tout signe clinique de cardiomyopathie [170], suggérant que des dommages sub-cliniques répétés lors d'épisodes de stress sont impliqués dans le développement de la cardiomyopathie.



**Figure 23 : Effet d'un stress mécanique sur le dommage cardiaque et la survie chez la souris *mdx*.** La figure du haut présente le nombre de cardiomyocytes présentant un marquage positif à la sonde vitale bleu d'Evans, lors de différents tests visant à augmenter le stress mécanique, soit l'injection d'isoprotérénol, ou 10sec d'occlusion de l'aorte. Les valeurs moyennes et les écarts types sont représentés. La figure du bas présente la courbe de survie d'animaux ayant subi une constriction partielle de l'aorte. Adapté de (Danialou et al. 2001).

### **4.3 Mécanismes impliqués dans la vulnérabilité des cardiomyocytes au stress et relation avec les mitochondries**

Bien que la cause primaire de la DMD (*i.e.* l'absence de dystrophine) soit connue depuis plusieurs années, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette susceptibilité musculaire au stress et dans le développement de la pathologie demeurent encore mal compris, particulièrement dans le cœur, où la littérature est moins abondante que pour le muscle squelettique. Une conclusion a cependant été établie grâce aux travaux réalisés au cours des dix dernières années : l'instabilité et la rupture de la membrane sarcolemmale des cardiomyocytes causée par l'absence de dystrophine fonctionnelle ne peut à elle seule expliquer le développement de la cardiopathie. Cette section abordera donc, dans un premier temps, les principaux facteurs qui semblent impliqués dans le processus pathologique au niveau des cardiomyocytes, soit la surcharge calcique, le stress oxydant ainsi que le déficit en oxyde nitrique (NO). Compte tenu des objectifs de la thèse, une attention particulière sera portée à l'interrelation entre ces facteurs et les mitochondries. Une revue des études ayant spécifiquement investigué la présence de dysfonctions mitochondriales primaires dans la DMD sera également présentée. Finalement, l'usage de stratégies pharmacologiques visant la protection mitochondriale dans la DMD sera également discutée.

### 4.3.1 Surcharge calcique

L'entrée excessive de calcium en provenance du milieu extracellulaire est une des caractéristiques de la DMD [159]. En effet, bien qu'une augmentation chronique de la concentration de calcium libre intracellulaire ne soit pas systématiquement rapportée dans les fibres musculaires dystrophiques [6, 8, 171, 172], il est clair que le stress mécanique engendre une augmentation de la prise calcique autant dans les fibres musculaires [8] que dans les cardiomyocytes [6, 9].

Bien que ceci ait été initialement attribué aux microdéchirures du sarcolemme induites par le stress mécanique [9, 173], il est maintenant bien établi que d'autres mécanismes y contribuent [159]. En effet, plusieurs études ont démontré que l'imposition d'un stress mécanique sur des myocytes (squelettiques et cardiaques) menait à l'activation aberrante de plusieurs canaux calciques notamment : 1) les canaux calciques voltage indépendants sensibles à l'étirement (SACs) [174, 175], 2) les canaux calciques réserve dépendants (SOCs) [176-178], qui inclue la famille des récepteurs transitoires au potentiel canonique (TRPC) et 3) les récepteurs à la ryanodine [179]. Par ailleurs, Millay et al. [180] ont démontré qu'il était possible d'obtenir un phénotype semblable à celui de la DMD en surexprimant le récepteur transitoire au potentiel canonique 3 (TRPC3) dans un muscle par ailleurs normal, indiquant clairement le rôle potentiel de ces canaux dans la surcharge calcique et la progression de la DMD. Par ailleurs, certaines études effectuées sur le muscle squelettique dystrophique ont rapporté une diminution de l'expression de la calsequestrine et de la sarcalumenine, deux protéines du réticulum sarcoplasmique

impliquées dans le stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  [181, 182], ce qui pourrait être en partie responsable de l'augmentation des niveaux de calcium libre dans le cytosol. Cependant, il n'est pas clair si le même phénomène existe dans le cœur.

L'entrée excessive de calcium peut engendrer des conséquences néfastes pour la fibre musculaire, notamment au niveau mitochondrial. Plusieurs études réalisées sur des cardiomyocytes [183, 184] et des myocytes [185] indiquent que les mitochondries, en raison de leur localisation à proximité du réticulum sarcoplasmique et des tubules-T, prennent rapidement le  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans le cytosol pendant la dépolarisation. Ainsi, dans les myocytes dystrophiques, les mitochondries sont potentiellement plus susceptibles à l'afflux accru de  $\text{Ca}^{2+}$  lors de l'activation aberrante des canaux calciques sarcolemmaux [177, 178]. Tel que discuté à la section 2.3.2.1, cette entrée excessive de  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait engendrer l'ouverture du PTP, ainsi que ses conséquences, qui incluent (selon la durée d'ouverture et le nombre de mitochondries impliquées) une production accrue de ROS [186, 187], une défaillance énergétique et l'activation de la mort cellulaire apoptotique ou nécrotique [56].

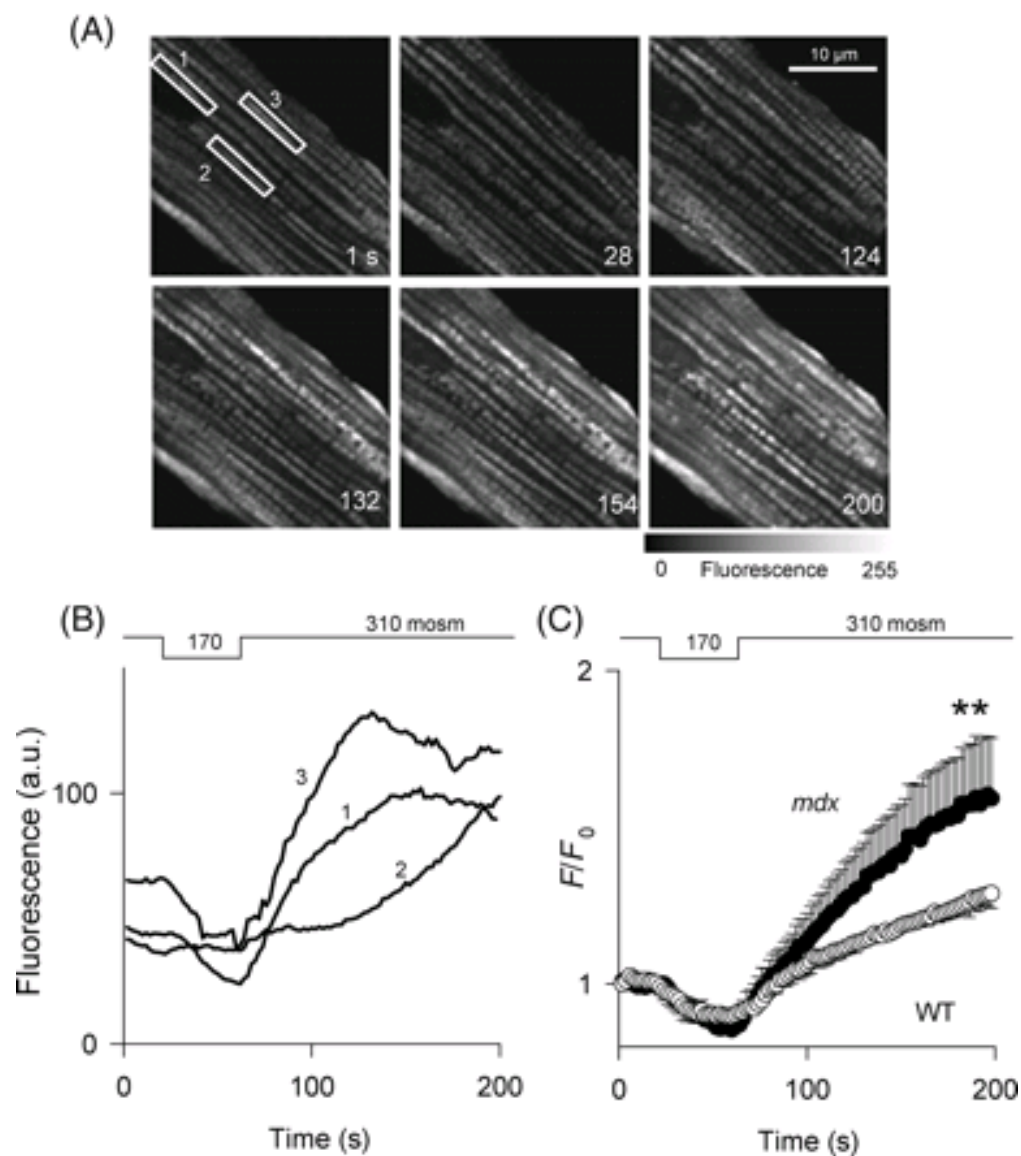
Bien qu'aucune donnée ne soit disponible pour le cœur entier chez de jeunes souris *mdx*, cette hypothèse est appuyée par les résultats d'une étude récente de Jung et al. [6], dans laquelle la prise de calcium mitochondriale a été mesurée sur des cardiomyocytes isolés et soumis à un stress mécanique *in vitro* (stress hypoosmotique) (Figure 24). Ces auteurs ont démontré une accumulation rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries de cardiomyocytes *mdx* qui était généralement suivie par

une perte soudaine de leur potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ), suggérant (mais ne prouvant pas) l'ouverture du PTP (Figure 25). L'accumulation rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries a également été rapportée au niveau du muscle squelettique par ce groupe de recherche, en plus d'une plus grande production de ROS à la suite d'un stress hypoosmotique (Figure 26 et 27) [8]. Par ailleurs, il est important de mentionner une étude récente du groupe de Molkentin [188] démontrant que l'administration d'un ligand de la cyclophiline D (le Debio025) chez la souris *mdx* diminuait la fibrose et le dommage au niveau des muscles squelettiques et ce, de façon plus efficace que la prednisone (un glucocorticoïde habituellement utilisé dans le traitement de la DMD) [189]. Bien que les auteurs n'aient pas investigué les effets de ce traitement sur la pathologie cardiaque, leurs données supportent l'implication du PTP dans la progression de la maladie.

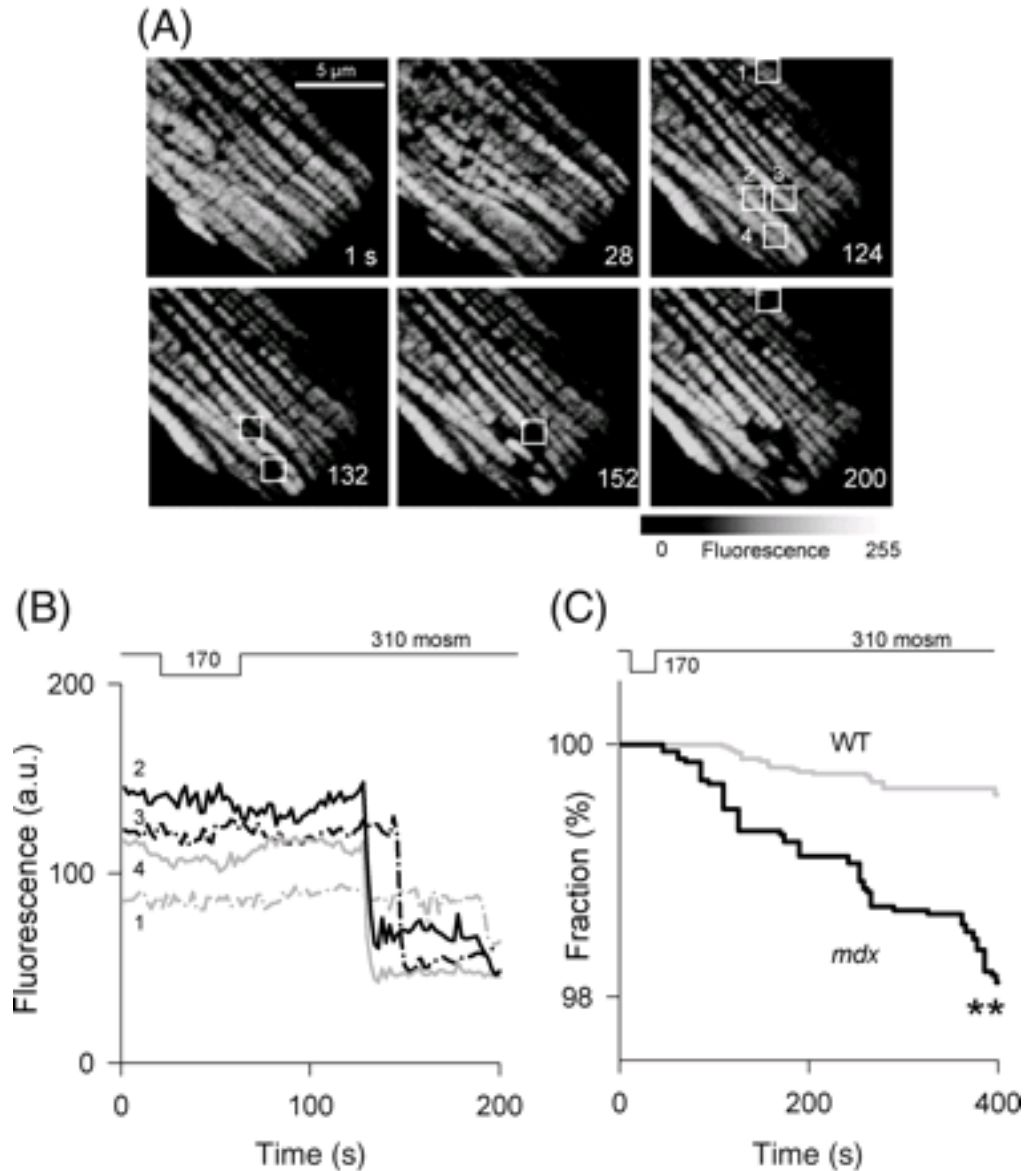
Une autre conséquence fâcheuse de l'entrée excessive de calcium dans les myocytes déficients en dystrophine est la dégradation des protéines musculaires par les calpaines, une famille de protéases activées par le calcium [190-193]. En effet, il a été démontré que l'activité des calpaines est plus élevée dans les muscles de souris *mdx* que dans ceux des souris contrôles [193]. Par ailleurs, deux études [194, 195] ont démontré que l'inhibition des calpaines, par un traitement avec la leupeptine ou la surexpression de la calpastatine, diminuait de manière significative le nombre et la taille des lésions musculaires chez la souris *mdx* [195]. Cependant, la contribution des calpaines dans la pathologie cardiaque n'est pas connue.



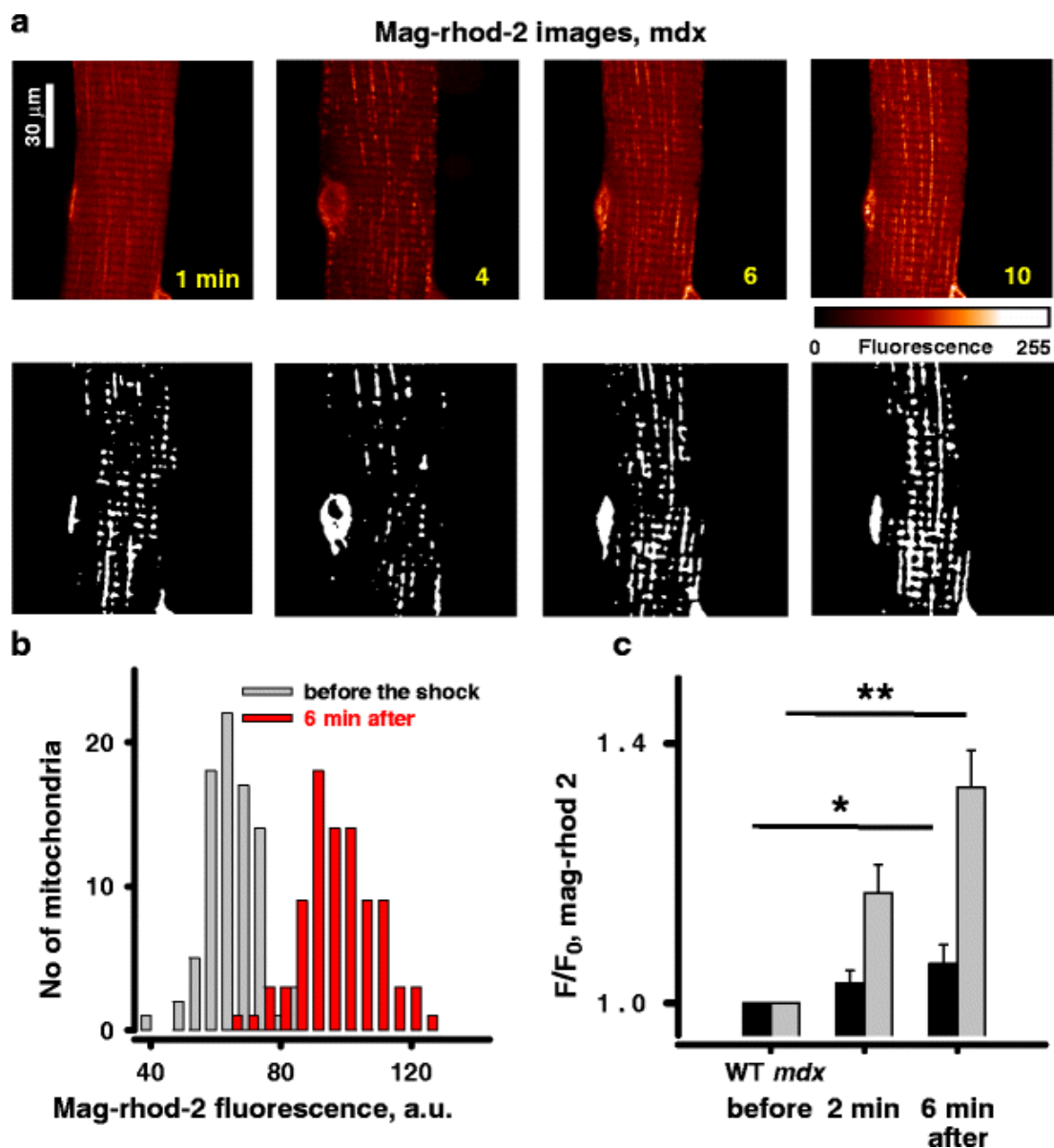
De façon intéressante, la présence de calpaines dans les mitochondries a été décrite récemment [196]. Ces calpaines pourraient notamment cliver l'échangeur sodium-calcium (NCX), le principal système d'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial [196]. Une activité accrue des calpaines mitochondriales chez la souris *mdx* pourrait donc favoriser la surcharge calcique mitochondriale, l'ouverture du PTP et la relâche de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. Cependant, l'activité des calpaines mitochondriales n'a jamais été mesurée chez la souris *mdx*.



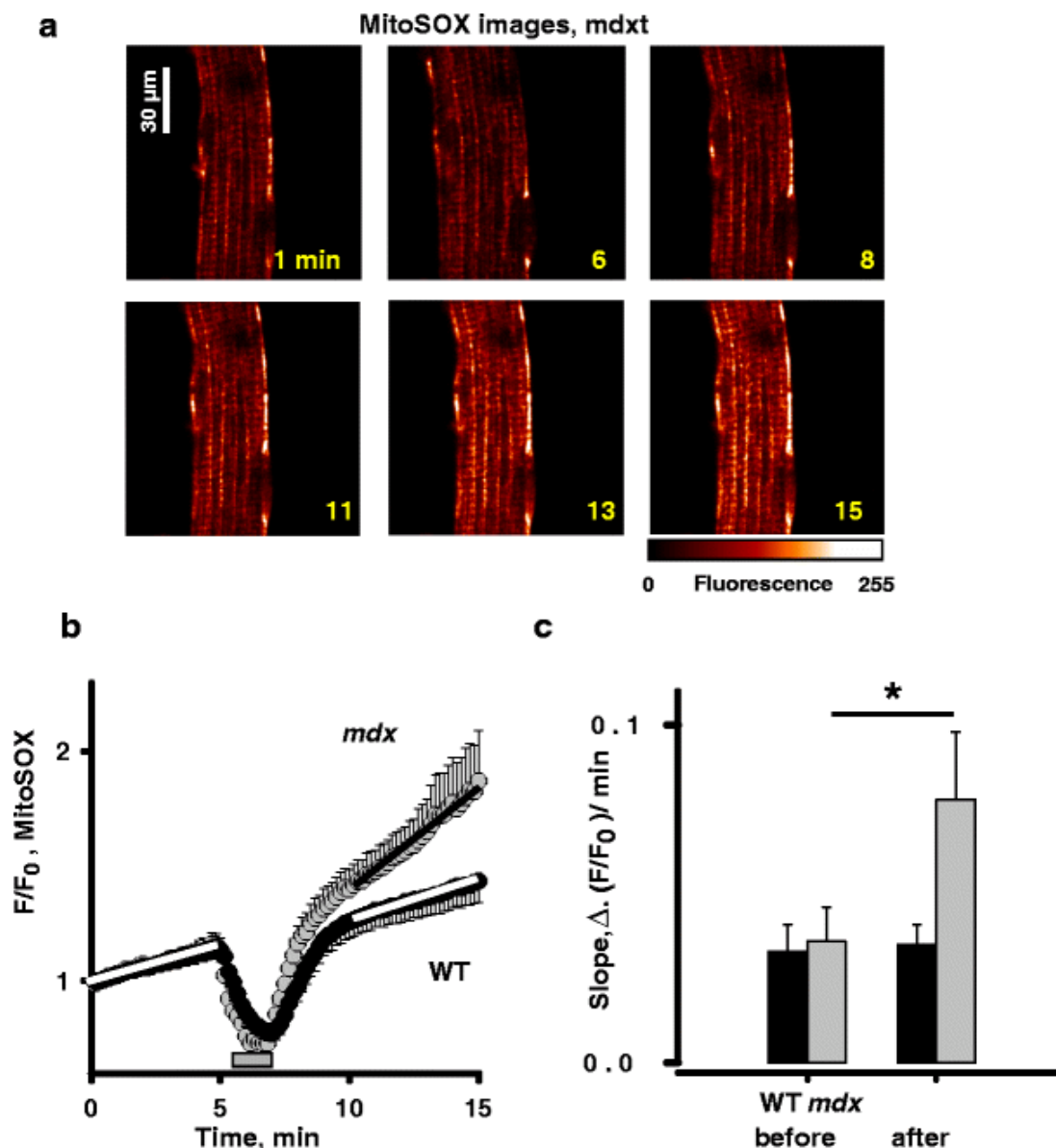
**Figure 24 : Prise excessive de calcium mitochondrial dans des cardiomyocytes de cœurs *mdx* soumis à un stress mécanique *in vitro* :** (A) Images de fluorescence avec la sonde calcique mitochondriale Rhod-2 dans des myocytes *mdx*, au cours du protocole de stress osmotique. (B) Quantification de la fluorescence de Rhod-2 au cours du temps pour les zones d'intérêts marquées (1–3 dans A). (C) Résultats moyens obtenus pour les cellules *mdx* (cercles noirs) et les cellules contrôles (cercles blancs) ( $n = 6$  et  $8$  cellules  $N = 2$  et  $3$  souris). Adapté de (Jung C et al. 2008).



**Figure 25 : Perte du potentiel membranaire mitochondrial dans les cardiomyocytes de cœurs *mdx* soumis à un stress mécanique *in vitro*.** (A) Images de fluorescence de la sonde potentiométrique TMRE dans les cardiomyocytes *mdx* au cours du choc osmotique. (B) Changements de la fluorescence dans les zones d'intérêts encadrées en (A), correspondant à des mitochondries individuelles. (C) Fraction de mitochondries demeurant polarisées après le choc osmotique dans le groupe *mdx* (ligne noire) et contrôle (ligne grise).  $n = 10$  et  $9$  cellules,  $N = 3$  et  $3$  souris. Adapté de Jung C et al. 2008



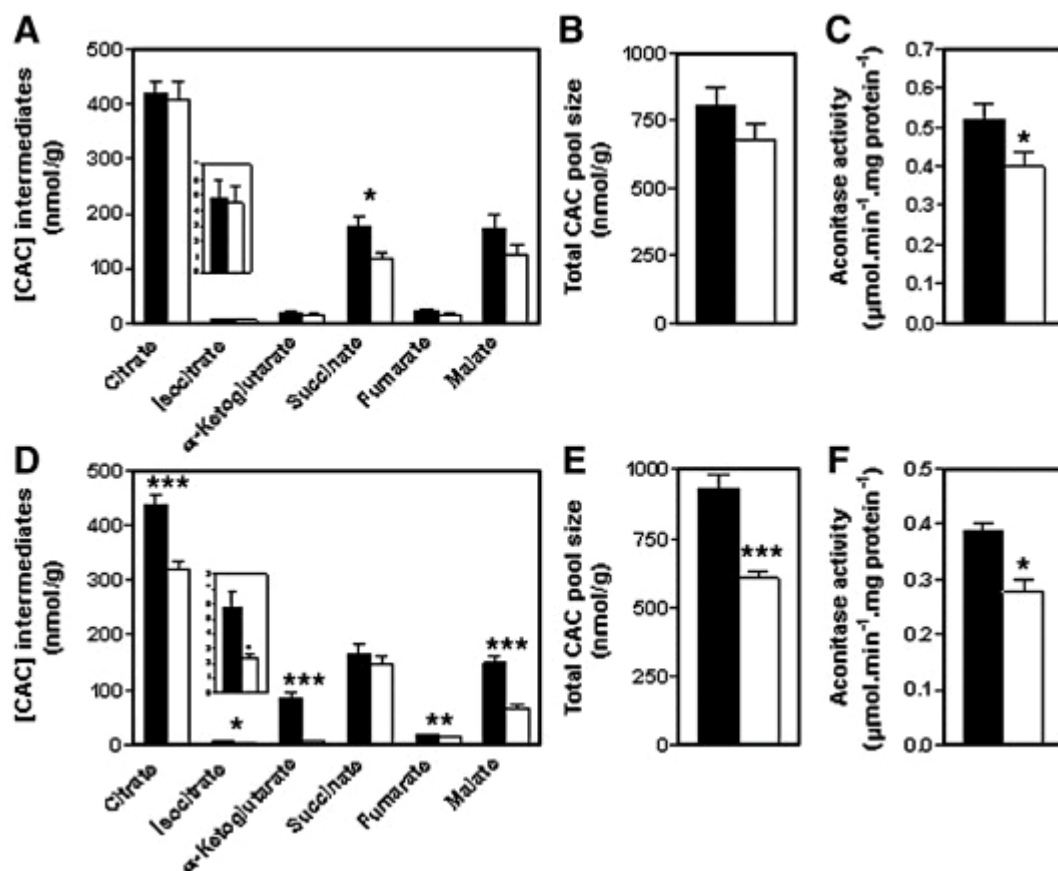
**Figure 26 : Prise excessive de calcium mitochondrial dans des fibres musculaires *mdx* soumises à un stress mécanique *in vitro*.** (A) Images de fluorescence de la sonde calcique mitochondriale mag-Rhod-2 dans des cellules *mdx* avant (image à 1min), durant (images 4 min) et après (images 6 et 10min) un choc osmotique. (B) Histogramme de fréquence présentant la fluorescence dans les mitochondries identifiées avant (barres grises) et après (barres rouges) le choc osmotique. (C) Augmentation moyenne de fluorescence mitochondriale après le choc osmotique dans les fibres *mdx* (barres grises) et contrôles (barres noires). Adapté de Shkryl et al 2009



**Figure 27 : La production mitochondriale de superoxyde dans des fibres musculaires *mdx* soumises à un stress mécanique *in vitro*.** (A) Images de fluorescence de la sonde MitoSOX dans des fibres musculaires *mdx* avant (image à 1 min), durant (image à 6 min) et après (images à 8, 11, 13, et 15 min) le choc osmotique. (B) Fluorescence moyenne de la sonde MitoSOX au cours du temps. (C) Pente moyenne mesurée avant et après le choc osmotique dans le groupe *mdx* (barres grises) et contrôle (barres noires) (n=8 *mdx* et 9 contrôles). Adapté de (Shkryl et al 2009).

#### 4.3.2 Les ROS

Des études récentes, notamment celles du groupe de Dave Allen [175] en Australie, ainsi que de Christine Des Rosiers à Montréal [7], ont rapporté la présence de stress oxydant précoce (à 9-12 semaines d'âge) dans le cœur de souris *mdx*, tel que mesuré par marquage histochimique avec la sonde dihydroethidine (DHE) et l'activité tissulaire de l'aconitase (Figure 28) et de la NADP-isocitrate déshydrogénase, deux enzymes du cycle de Krebs susceptibles à l'inactivation par les ROS. Par ailleurs, le groupe de Niggli a également rapporté une production accrue de ROS dans des cardiomyocytes provenant de jeunes souris *mdx*, telle que mesurée par la fluorescence du DCFH, une sonde sensible à plusieurs types de ROS [6].



**Figure 28 : Intermédiaire du cycle de Krebs du myocarde *in vivo* et après un protocole de perfusion cardiaque en mode travaillant chez des souris contrôles C57BL/10 et *mdx*.** Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM pour 6–11 cœurs non perfusés (A to C) et perfusés (D to F). Les quantités d'intermédiaires du cycle de Krebs des cœurs C57BL/10 (barres pleines) et les *mdx* (barres vides) ont été quantifiées par GCMS et par spectrophotométrie pour l'aconitase. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , et \*\*\* $P < 0.001$  pour le cœur de souris *mdx* vs. contrôle C57BL/10. Adapté de Khairallah M et al. 2007

Deux sources de stress oxydant semblent impliquées dans ce phénomène. La première source est la NADPH oxydase, un complexe enzymatique lié principalement au sarcolemme produisant l'anion superoxyde à partir du NADPH cellulaire et de l'oxygène. Plusieurs évidences expérimentales supportent l'implication de cette enzyme, les plus importantes étant : 1) une activité accrue de l'enzyme mesurée dans le cœur entier [197], et 2) une plus grande expression de la sous-unité catalytique gp91<sup>phox</sup> [8, 197] et de la sous-unité régulatrice Rac1 [197].

La seconde source de stress oxydant est vraisemblablement la mitochondrie, telle que suggérée par 1) la diminution dans le tissu cardiaque de l'activité de l'aconitase et de la NADP isocitrate déshydrogénase, deux marqueurs reconnus du stress oxydant mitochondrial [7] et 2) la production accrue de superoxyde mesurée sur des fibres musculaires isolées, à l'aide de MitoSOX (une sonde s'accumulant spécifiquement dans ces organelles) [8] (Figure 27). Dans l'étude de Shkryl et al [8], il est intéressant de noter qu'à l'état basal, la production de superoxyde mitochondrial était similaire dans les fibres musculaires *mdx* et contrôles et qu'un stress mécanique était nécessaire pour observer une production excessive dans le groupe *mdx* (Figure 27). Ces données suggèrent donc que la production excessive de superoxyde par les mitochondries est secondaire à un événement déclenché par le stress mécanique. Il est possible que la surcharge calcique et l'ouverture du PTP, qui tous deux augmentent la production mitochondriales de ROS [186, 187], soient les principaux facteurs responsables, bien qu'aucune donnée ne permette actuellement de l'établir. Par ailleurs, le métabolisme des ROS n'a jamais été investiguée *in vitro* sur des



mitochondries cardiaques isolées. On ne peut donc exclure, à ce stade, que des anomalies soient présentes dans les mitochondries cardiaques chez la souris *mdx* et contribuent à augmenter la production de superoxyde ou à diminuer son élimination.

D'autres évidences expérimentales suggèrent l'existence d'une interrelation étroite entre le stress oxydant et les anomalies de l'homéostasie du calcium dans la DMD. Une démonstration particulièrement frappante provient de l'étude de Williams et al. [197] démontrant que l'administration de l'antioxydant N-acetylcystéine (NAC), pendant trois semaines chez de jeunes souris *mdx* (9 semaines d'âge), permettait de corriger, partiellement, les anomalies de la dynamique calcique mesurée sur des cardiomyocytes isolés. Shkryl et al. [8] ont également démontré que l'entrée excessive de  $\text{Ca}^{2+}$ , induite par un stress osmotique sur des cardiomyocytes provenant de cœurs de souris *mdx*, était fortement atténuée par des mimétiques de la superoxyde dismutase (MnTBAP, Mn-cpx3 et TIRON), ainsi que par des inhibiteurs de la NADPH oxydase (DPI et apocynine). Cependant, l'inhibiteur de la xanthine oxydase (XO) allopurinol, ainsi que l'inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase (NOS) L-NAME, étaient sans effets sur l'entrée excessive de  $\text{Ca}^{2+}$  [8]. Par contre, bien que des anti-oxydants ciblés aux mitochondries soient maintenant disponibles, comme le MitoQ [198] ou le peptide SS développé par Szeto HH et Schiller PW [199], leurs effets n'ont jamais été testés chez la souris *mdx*.

Dans l'ensemble, ces données suggèrent donc que le stress oxydant en général et, plus particulièrement le superoxyde produit par la NADPH oxydase, amplifie les

entrées de calcium dans les myocytes dystrophiques. Puisque l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  stimule la production de ROS, ce phénomène pourrait résulter en un cercle vicieux d'autoamplification. Bien que les mécanismes sous-jacents aux effets du stress oxydant sur les entrées calciques n'aient pas été déterminés, une des hypothèses émises est que l'oxydation des protéines impliquées dans le mécanisme de couplage excitation-contraction, notamment le récepteur à la ryanodine (RyR2, RYR2), la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA), ainsi que le phospholamban (PLN), soit responsable [8, 197].

#### **4.3.3 Déficit de signalisation par l'oxyde nitrique**

La dystrophine, outre son rôle dans la stabilisation de la membrane sarcolemmale, semble également agir à titre d'amarrage pour des protéines intracellulaires impliquées dans la signalisation [200]. C'est notamment le cas pour la forme neuronale de l'enzyme oxyde nitrique synthase (nNOS) qui se trouve normalement liée à la dystrophine par l'intermédiaire de la synthrophine [201]. Dans la DMD, la mutation de la dystrophine tronque la portion C-terminale de la dystrophine à laquelle se lie normalement la synthrophine, résultant en une délocalisation de la nNOS [202], une forte baisse de son activité et un déficit de signalisation NO-dépendante dans les fibres musculaires squelettiques [203-205]. Wehling et al. [203] ont démontré que cette anomalie contribuait au phénotype dystrophique. Dans cette étude, les auteurs ont en effet observé que l'insertion dans le muscle squelettique d'un transgène contenant la nNOS permettait de diminuer l'inflammation musculaire et la lyse membranaire [203]. Au niveau cardiaque, bien

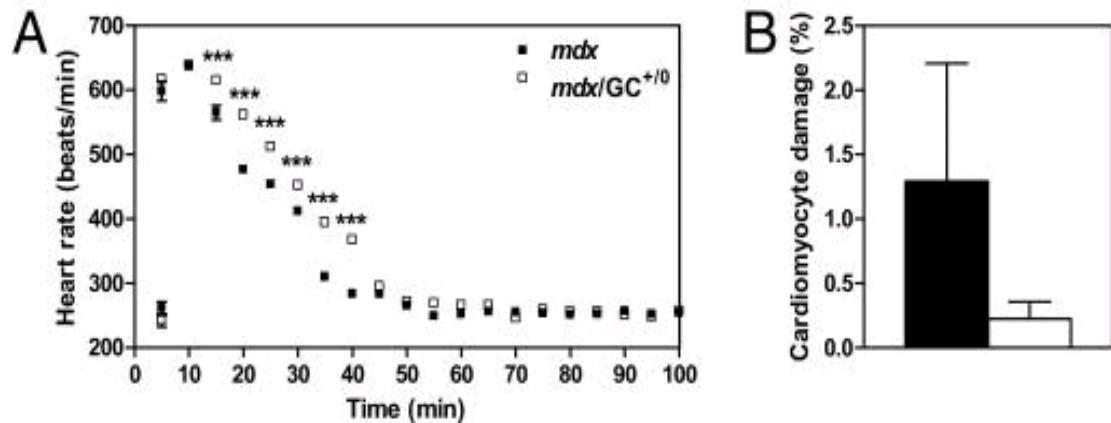
que la délocalisation de la nNOS n'ait pas encore été établie, une diminution de l'activité de la nNOS de l'ordre de 80 % a été rapportée [161]. De plus, l'expression forcée d'un transgène contenant nNOS s'est avérée capable de corriger en partie les anomalies électrocardiographiques typiquement observées chez la souris *mdx*. [206].

Bien que ce déficit de signalisation NO-dépendant contribue à la pathologie, autant dans le muscle squelettique que le cœur [169, 203, 206], les mécanismes cellulaires demeurent encore mal définis, bien que différentes hypothèses soient actuellement suggérées. Le premier mécanisme suggéré est un défaut de vasodilatation au niveau de la circulation locale causé par le déficit en NO [207-210]. Dans le muscle squelettique, ceci induirait des ischémies focales qui pourraient expliquer la présence de nécrose régionale typiquement retrouvée chez la souris *mdx* [207] et d'autres modèles animaux de dystrophie [208-210]. Cette ischémie transitoire musculaire a également été démontrée chez des patients DMD [211]. Cependant, la contribution de ce mécanisme dans le cœur demeure controversée. En effet, des études de tomographie à émission de positrons ont démontré que la réserve coronaire était essentiellement normale chez les patients DMD [212]. De même, le débit coronaire mesuré sur des cœurs de souris *mdx* perfusé *ex vivo* en mode travaillant est similaire à celui des cœurs normaux [7].

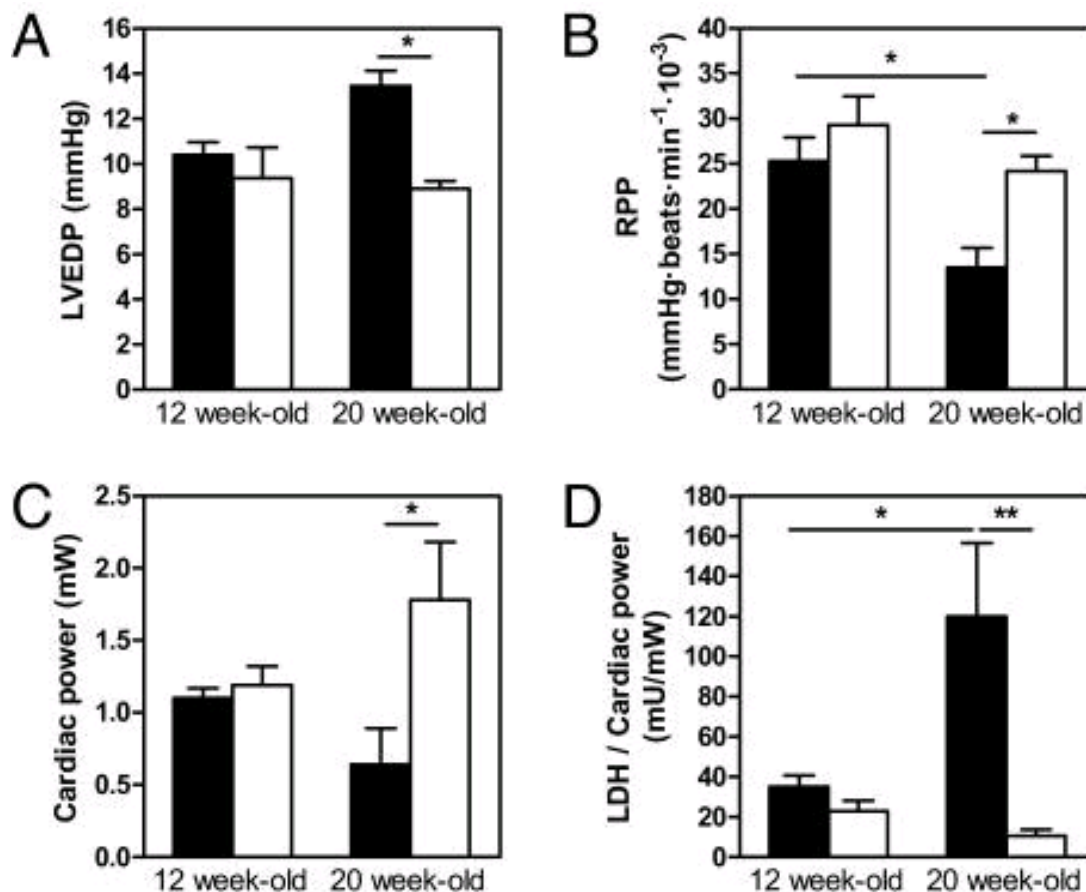
Un des principaux médiateurs du NO dans les cardiomyocytes est le GMPc produit par l'isoforme soluble de la guanylatse cyclase (sGC). Le GMPc est un important second messenger, impliqué notamment dans la régulation de protéines

kinases, de canaux ioniques et de phosphodiesterases. Une des cibles principales du GMPc est la serine/thréonine kinase GMPc-dépendante (PKG), une protéine exerçant des effets intracellulaires multiples en phosphorylant plusieurs cibles. Tel qu'élaboré ci-bas, un déficit en signalisation cGMP/PKG dans les cardiomyocytes explique, au moins en partie, la susceptibilité précoce du cœur dystrophique au stress mécanique.

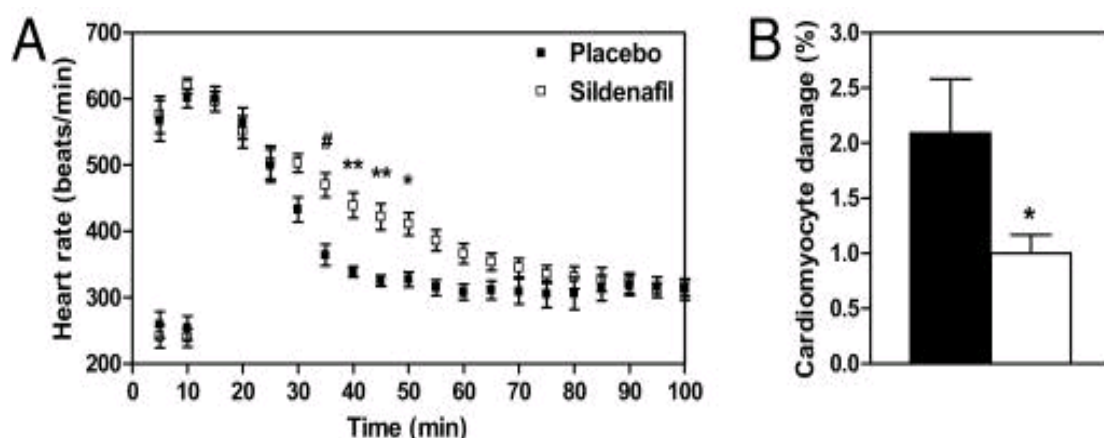
La principale évidence expérimentale en faveur de cette hypothèse provient d'une étude récente du laboratoire de Christine Des Rosiers à l'Institut de Cardiologie de Montréal [169]. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que la correction du déficit de signalisation GMPc/PKG par l'expression d'une forme constitutivement active de la guanylate cyclase soluble dans les cardiomyocytes de jeunes souris *mdx* (12 semaines) diminuait de façon significative le dommage cardiaque induit par un stress hémodynamique à l'isoproterenol (Figure 29) ou par perfusion cardiaque en mode travaillant (Figure 30). Un effet protecteur similaire était également observé chez des souris *mdx* à la suite d'un traitement d'une durée de six semaines avec le sildénafil (0,7 mg/kg i.p.), un inhibiteur de la dégradation du GMPc par la phosphodiesterase-5 (PDE-5) (Figure 31).



**Figure 29 : Fréquence cardiaque et quantification des dommages au sarcolemme des cardiomyocytes *in vivo*, à la suite d'une forte augmentation du stress mécanique cardiaque par la perfusion d'isoprotérénol chez les souris *mdx* et *mdx* / GC<sup>+/0</sup>.** Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM pour 4–6 expériences chez les *mdx* (barres pleines) ou les *mdx* / GC<sup>+/0</sup> (barres vides). La fréquence cardiaque était mesurée en permanence par un électrocardiogramme (A), et les dommages au sarcolemme des cardiomyocytes ont été évalués en utilisant le colorant bleu Evans (B). \*\*\* $P < 0.001$  pour le cœur de souris *mdx* vs les *mdx* / GC<sup>+/0</sup>. Adapté de Khairallah M et al. 2008



**Figure 30 : Paramètres fonctionnels et physiologiques lors d'un protocole de perfusion cardiaque en mode travaillant sur de souris *mdx* et *mdx/GC<sup>+/0</sup>* de 12 et 20 semaines.** Les valeurs sont exprimées par la moyenne  $\pm$  SEM et représentent la moyenne pour 20 à 30min de perfusion. Le groupe *mdx* (barres pleines) et *mdx/GC<sup>+/0</sup>* (barres ouvertes) a un  $n = 4$  souris par groupe. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$  *mdx* vs. *mdx/GC<sup>+/0</sup>*. LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; RPP, rate-pressure product. Khairallah M et al. 2008



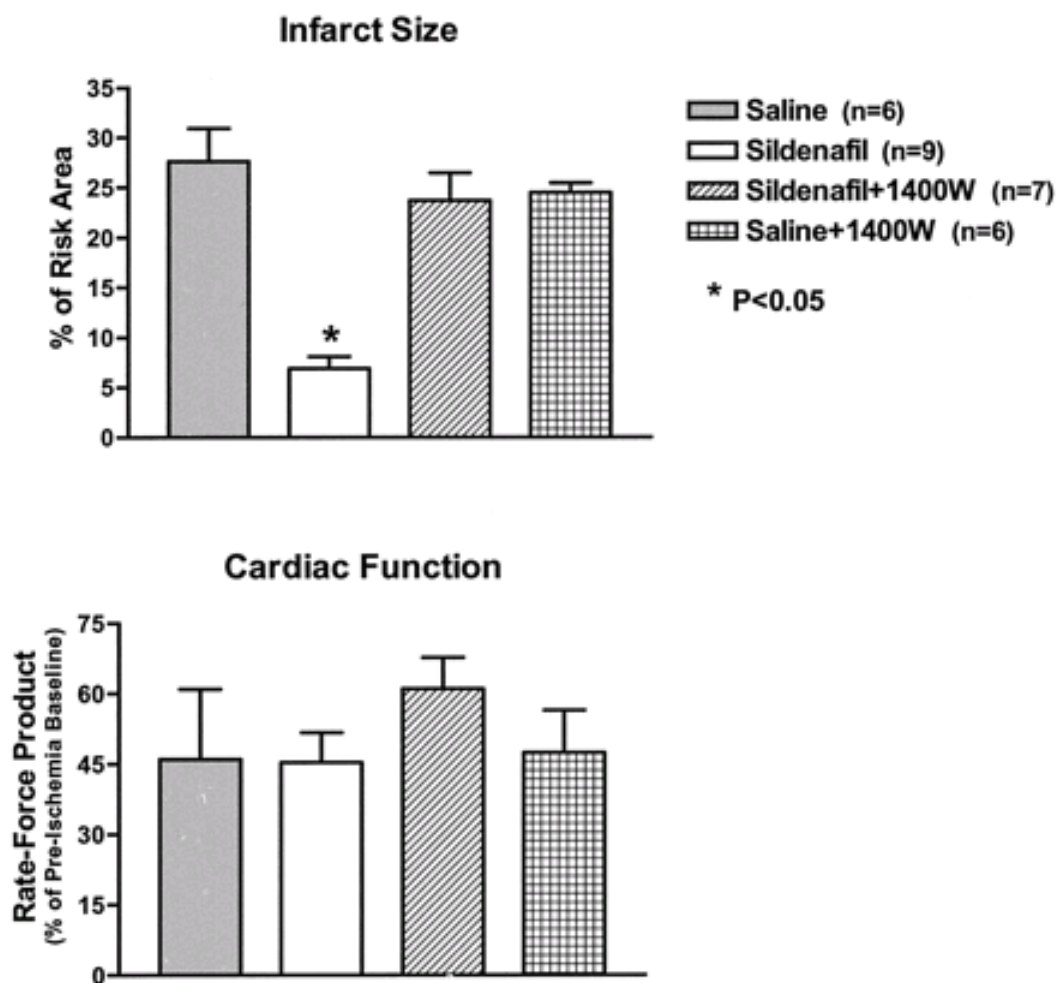
**Figure 31 : Fréquence cardiaque et quantification des dommages au sarcolemme des cardiomyocytes *in vivo*, à la suite d'une forte augmentation du stress mécanique cardiaque par la perfusion d'isoprotérénol chez les souris *mdx* traitées au sildénafil ou avec le placebo.** Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM pour 4–6 expériences chez le groupe placebo (barres pleines) ou sildénafil (barres vides). La fréquence cardiaque était mesurée en permanence par un électrocardiogramme (A), et les dommages au sarcolemme des cardiomyocytes ont été évalués en utilisant le colorant bleu Evans (B). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , et # $P < 0.001$  pour le groupe placebo vs sildénafil. Adapté de Khairallah M et al. 2008

À l'heure actuelle, les mécanismes responsables de cet effet protecteur chez la souris *mdx* sont inconnus, Cependant, il existe plusieurs possibilités, En effet, des études ont démontré que le GMPc par l'intermédiaire de PKG limite les entrées de calcium cytosolique de plusieurs façons : 1) en inhibant la synthèse d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et la relâche de Ca<sup>2+</sup> de réserves intracellulaires via le récepteur à l'IP<sub>3</sub>, 2) en activant SERCA2a et 3) en diminuant l'influx de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire via les canaux de type L [213, 214] et potentiellement les canaux TRPC [215]. Un déficit de signalisation GMPc/PKG pourrait donc en théorie être un des facteurs expliquant les entrées excessives de calcium observées dans les myocytes dystrophiques (voir 4.3.1).

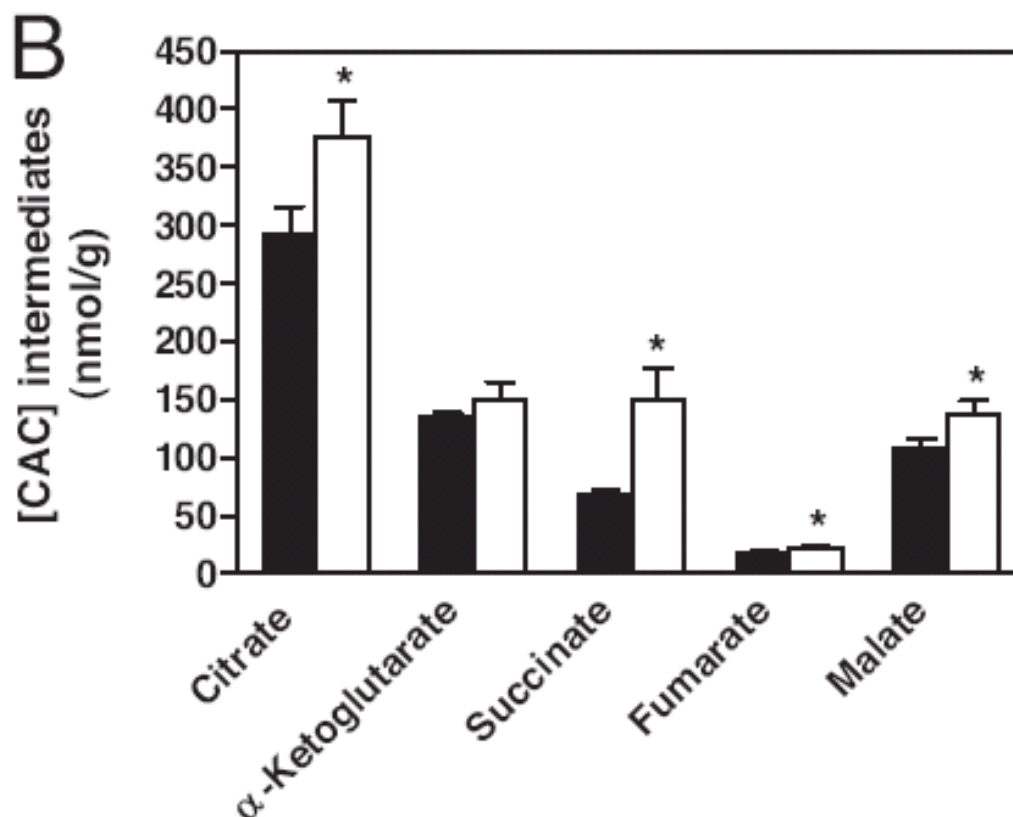
D'autre part, plusieurs études ont démontré que l'axe de signalisation GMPc-PKG induisait une protection cardiaque [216, 217] similaire à celle du préconditionnement ischémique, dans laquelle les mitochondries jouent un rôle important [86, 218-220]. En effet, des études menées chez le lapin et la souris ont démontré que l'augmentation des niveaux de GMPc, induite par l'administration aiguë de sildénafil 30 min à 24 heures avant une période d'ischémie-reperfusion, diminuait la taille de l'infarctus [216, 217] (Figure 32). De manière similaire, une autre étude a rapporté que l'administration de sildénafil chez des souris traitées à la doxorubicine résultait en une amélioration des fonctions cardiaques et une diminution de l'activité de la voie mitochondriale de l'apoptose [221]. Fait notable, les études de Ockaili [216] et Salloum [222] ont démontré que l'effet protecteur du sildénafil était aboli par l'administration de 5-HD, un inhibiteur des canaux K<sub>ATP</sub> mitochondriaux,



suggérant que les mitochondries jouaient un rôle clé dans l'effet protecteur du GMPc. Par ailleurs, des expériences réalisées sur des mitochondries cardiaques isolées ont démontré que l'ajout de PKG recombinante et de GMPc *in vitro* résultait en une inhibition de l'ouverture du PTP, via un mécanisme impliquant l'ouverture des canaux  $K_{ATP}$ . [223, 224]. Bien qu'aucune donnée directe ne permet de l'établir à l'heure actuelle, il est donc possible que le déficit de signalisation GMPc/PKG dans le cœur des souris *mdx* rende ce mécanisme de protection inefficace et induise une vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP en période de stress. En support à cette hypothèse, le laboratoire de Christine Des Rosiers a démontré que l'expression du transgène sGC dans le cœur *mdx* permettait d'abolir la perte d'intermédiaire du cycle de Krebs, observée dans les cœurs *mdx* par rapport aux cœurs contrôles (Figure 33). Bien que ces mesures ne reflètent pas directement l'ouverture du PTP, elles suggèrent néanmoins la présence d'anomalies mitochondriales qui sont corrigibles par une augmentation de la signalisation GMPc/PKG.



**Figure 32 : Effet du Sildenafil et/ou du 1400W** sur la taille de l'infarctus (haut) et la récupération des fonctions cardiaque (bas) lors d'une I-R. Adapté de Salloum F, et al. 2003



**Figure 33 : Intermédiaire du cycle de Krebs après un protocole de perfusion cardiaque en mode travaillant chez des souris *mdx* et *mdx* / *GC*<sup>+/0</sup>.** Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM pour quatre cœurs par groupe. Les quantités d'intermédiaires du cycle de Krebs des cœurs *mdx* (barres pleines) et *mdx* / *GC*<sup>+/0</sup> (barres vides) ont été quantifiées par GCMS et par spectrophotométrie. \* $P < 0.05$  pour les cœurs de souris *mdx* vs les *mdx* / *GC*<sup>+/0</sup>. Adapté de Khairallah M et al. 2008

#### 4.3.4 Anomalies au niveau de l'oxydation phosphorylante :

Seulement quelques études se sont penchées sur l'impact de la DMD sur l'oxydation phosphorylante. Chez la souris *mdx* âgée de 16-24 semaines, Kuznetsov et al. [225] ont rapporté une perte de capacité respiratoire mesurée sur des fibres musculaires perméabilisées et des mitochondries isolées, ainsi qu'une diminution de l'expression de plusieurs ARNm encodés dans l'ADN mitochondrial, suggérant la présence d'importantes anomalies respiratoires. Des dysfonctions respiratoires ont également été rapportées dans le muscle squelettique de patients DMD [226]. Cependant, dans l'étude de Kuznetsov et al. [225], des analyses similaires n'ont rapporté aucune anomalie au niveau cardiaque, qui, rappelons-le, ne présente pas encore de signes de cardiomyopathie à l'âge où les souris ont été étudiées. Ces données suggèrent donc que les anomalies de l'oxydation phosphorylante sont observables seulement lorsqu'une pathologie franche est déjà installée.

À la lumière des évidences disponibles dans la littérature, trois études (études 2, 3 et 4), portant sur la phase précoce de la cardiomyopathie associée à la DMD, ont donc été réalisées à l'aide de la souris *mdx*. Dans la première étude, publiée dans *The Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, nous avons développé un modèle expérimental de perfusion cardiaque *ex vivo* permettant de quantifier directement l'ouverture du PTP et ses conséquences dans le cœur entier soumis à une ischémie-reperfusion. Dans la seconde étude, publiée dans *The American Journal of Physiology*, nous avons poursuivi les travaux initiés par l'équipe de Christine Des

Rosiers, en déterminant de façon directe si l'effet protecteur du sildénafil contre le dommage cardiaque induit par le stress impliquait une inhibition de l'ouverture du PTP. Dans cette étude, nous avons également investigué certains facteurs potentiellement impliqués dans la susceptibilité mitochondriale à l'ouverture du PTP dans le cœur *mdx*. Finalement, dans la troisième étude qui sera soumise pour publication prochainement, nous avons investigué l'effet d'un anti-oxydant ciblé aux mitochondries (le SS-31) sur l'ouverture du PTP et le dommage cardiaque en réponse au stress.

## **Chapitre 2- Résultats**

## 5 RESULTATS

### 5.1 Article 1

#### Titre

Early predictors of cardiac decompensation in experimental volume overload.

#### Auteurs

Oliver-Dussault C, Ascah A, Marcil M, Matas J, Picard S, Pibarot P, Burelle Y, Deschepper CF.

#### Journal

Publié le 1<sup>er</sup> mai 2010 dans le *Molecular and cellular biochemistry* (Mol Cell Biochem. 2010 May;338(1-2):271-82)

Reproduit avec la permission de Springer Link

## **Early predictors of cardiac decompensation in experimental volume overload**

Christelle Oliver-Dussault, B.Sc.<sup>1\*</sup> Alexis Ascah, M.Sc.<sup>2\*</sup>, Mariannick Marcil, Ph.D., Jimmy Matas, M.Sc.<sup>2</sup>, Sylvie Picard, B.Sc.<sup>1</sup>, Philippe Pibarot, Ph.D.<sup>3</sup>, Yan Burelle, Ph.D.<sup>2</sup>, Christian F. Deschepper, M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM) and <sup>2</sup>Department of kinesiology, Université de Montréal, Montreal (QC) Canada and <sup>3</sup>PP

\*these 2 authors contributed equally to the manuscript

**Running head:** Early predictors of heart failure after volume overload

Corresponding author: Christian F. Deschepper



**ABSTRACT**

In humans, volume overload (VOL) increases the risk of sudden cardiac death, but there is also important inter-individual variability, presumably because of differences in genetic backgrounds. Although VOL has rapid effects on myocardial properties, it is not known to which extent the severity of these early responses correlate with the effect of sustained VOL on mortality. In order to test this question, we induced VOL in male rats from two genetically distinct strains [i.e., Sprague–Dawley (SD) and Wistar Kyoto-derived Hyperactive (WKHA) rats] by creating a surgical aorto-caval fistula (ACF). Only 36% of SD rats remained alive after 39 weeks of ACF, in contrast to 82% of the operated WKHA rats. We also monitored myocardial hemodynamic function, mitochondrial properties, left ventricular (LV) morphology and LV wall diastolic properties at different times ranging from 2 to 12 weeks after either ACF or sham surgery. ACF had a rapid impact on the LV walls of both rat strains, but the only variables that were affected to a greater extent in the mortality-prone SD strain were normalized LV weight, LV cavity area, and myocardial wall stiffness. In contrast, there were only marginal strain-related differences in the way ACF affected hemodynamic and mitochondrial functions. Thus, while early morphologic responses of LV walls to ACF (along with their downstream consequences on myocardial diastolic wall stress) correlated well with strain-dependent differences in late mortality, other functional changes showed no predictive effects. Close monitoring of early changes in cardiac geometry (as well as new methods to analyze myocardial diastolic strain) might, therefore, be helpful to further improve risk stratification in humans with volume overload cardiopathies.

Keywords Volume overload cardiopathy - Congestive heart failure - Animal  
models - Cardiac risk predictors - Cardiac remodeling - Genetic factors

## INTRODUCTION

Chronic increases in cardiac workload induce structural ventricular changes (also referred to as “cardiac remodeling”). In pathologic situations, such remodeling may initially constitute an adaptive mechanism that accompanies a phase called compensated hypertrophy, but over time, it may become maladaptive and eventually lead to decompensated heart failure [1]. However, why and how the transition from compensated hypertrophy to decompensated heart failure does occur remains largely unknown, and these questions keep representing an important area of discovery in the field of heart failure research [2].

Concentric hypertrophy (related to pressure overload) and eccentric hypertrophy (related to volume overload) constitute two major traditional patterns of cardiac remodeling [3]. Pure volume overload (VOL) typically occurs in the cases of mitral regurgitation [4]. Although this condition may be tolerated for a long time in some patients, it is nonetheless associated with a high mortality rate [5, 6]. In particular, the risk of sudden death due to rapid and irreversible left ventricular dysfunction is increased 10–100 times in such patients [7, 8]. Strikingly, sudden declines in cardiac function may occur in patients who were otherwise asymptomatic previously [5, 7], which further illustrates the potential utility of good predictors. Animal models of VOL might be useful in this regard. In rats, VOL can be induced experimentally by surgically creating an aorto-caval fistula (ACF) [9]. Within a matter of hours, this maneuver induces profound changes in ventricular collagen content and metalloprotease activity [10–12], followed by progressive morphologic,

functional, and biochemical changes in subsequent weeks [12–15]. Eventually, death by congestive heart failure may occur at a later stage. For instance, male outbred Sprague–Dawley (SD) rats with ACF die from sudden and irreversible congestive heart failure within a period of time ranging from 4 to 32 weeks after operation [14]. Nonetheless, the length of the time window during which mortality occurs in these animals indicates that there is considerable inter-individual variability in the mortality response.

In the course of preliminary experiments, we induced ACF in a genetically different and distant inbred rat strain called Wistar Kyoto-derived Hyperactive (WKHA), and have observed that there was very little post-ACF mortality in that strain despite the fact that the surgery induced considerable remodeling of the ventricles [16]. Given the fact that late mortality could be predicted in these 2 different rat strains on the basis of their different genetic background, we reasoned that differences in the early effects of ACF on the hearts of these 2 strains might lead to the identification of elements of the response that are most likely predictors of later mortality. We, therefore, measured several morphologic, hemodynamic, and biochemical variables as well as indices of mitochondrial vulnerability at several times (ranging from 2 to 12 weeks) after induction of ACF in male animals from both strains.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Animals and surgical procedures*

All procedures on animals were approved by the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) Institutional Animal Care Committee and conducted according to guidelines issued by the Canadian Council on Animal Care. The inbred WKHA/Cfd rats (hereafter identified as WKHA) originated from a colony maintained at the IRCM, as registered with the Institute of Laboratory Animal Resources. The outbred Hsd:SD rats (hereafter identified as SD) were obtained from the commercial vendor Harlan (Indianapolis, IN). These two rat strains are very different from a genetic standpoint, as evidenced by the fact that the rate of polymorphisms between SD and either WKY or SHR rats (from which the WKHA is derived) averages ~70% in a large panel of microsatellite genetic markers (<http://www.rgd.mcw.edu>). All surgeries (either sham or ACF) were performed on males at 10 weeks of age, as described previously [9, 17]. Importantly, we verified at the time of sacrifice that a functional fistula could indeed be observed de visu in all ACF-operated animals. The rare cases of ACF animals where a functional fistula was no longer obvious at the time of sacrifice were not included in the experimental group.

For mortality experiments, we performed ACF surgery on 22 SD and 13 WKHA male rats, sham surgery on 10 SD male rats, and followed all animals longitudinally for 40 weeks. Of note, it had previously been reported that ACF-induced CHF could be detected when signs of labored respiration occurred along with a gain of body weight >50 g over 7 days [14]. Our own pilot experiments confirmed that all animals displaying such symptoms invariably died within the next following few days. All experimental animals were, therefore, sacrificed as soon as CHF could be established and counted as having died of CHF. When CHF occurred in ACF-

operated SD rats between 10 and 15 weeks after surgery, we collected the hearts of these animals (along with that of sham-operated age-matched healthy SD counterparts) for measurements of cardiac mitochondria functions (see below).

#### *Hemodynamic measurements*

Either sham or ACF surgery was performed on groups of 7–8 male SD and WKHA rats. Sham animals were sacrificed 2 weeks after the surgery. ACF animals were sacrificed at either 2, 4, or 8 weeks after surgery. One day before sacrifice, cardiac functional variables were measured in sedated animals with a Fr-2 single sensor pressure catheter (Millar Instruments; Houston, TX) and acquired with a PowerLab/8 nSP acquisition system (ADInstruments; Colorado Springs, CO) as described previously [17]. Measured variables were LV end-systolic pressure (LVESP), the maximum rate of positive ( $dp/dt$  max) and negative ( $dp/dt$  min) pressure changes, and the difference in LV diastolic pressure ( $\Delta$  LVDP) between the beginning and the end of the diastole).

#### *Diastolic LV wall and chamber characteristics*

Groups of SD and WKHA ( $n = 6–8$  per group) were sacrificed at 4 weeks after either ACF or sham surgery and the heart from each animal was removed with the ascending aorta attached. A PE90 catheter was inserted into the aorta above the level of insertion of the coronary arteries, and the heart was infused with a cold isotonic solution containing 100 mM KCl and 50 mM NaCl. After diastolic arrest was obtained, the catheter was pushed further into the LV cavity, and the latter was rinsed

with saline solution. In order to construct passive pressure–volume ( $P$ – $V$ ) curves, the LV was filled with saline using a catheter connected to a pump delivering 11.3  $\mu\text{l/s}$ , and pressure was recorded continuously with a calibrated pressure transducer [18]. The filling proceeded until intracavitary pressure reached 30 mm Hg. After repeating this procedure two other times, the LV of each diastole-arrested heart was filled with saline to a pressure of 15 mmHg, sealed, and fixed in its distended form in formalin. After 24 h of immersion in formalin, sagittal sections ( $\sim 2$  mm thick) were cut at the mid-ventricular level from all fixed LVs and examined on each side with a stereomicroscope. Images were captured as electronic files and analyzed using the Northern Eclipse version 6.0 software from Empix imaging (Mississauga, ON, Canada). For each heart section, we measured the surface occupied by the LV wall tissue (including septum) and the LV cavity (calculated by averaging the values obtained for each side of the section), and the relative wall thickness (RWT, defined as the ratio between the 2 previous measurements).

Wet lung weight was measured right after the time of collecting the hearts. In order to normalize organ weight values, tibia length was calculated by performing direct measurements on X-ray pictures of the hind legs of each sacrificed animal.

Passive diastolic wall characteristics were calculated from  $P$ – $V$  curves, as described previously [19–22]. The diastolic chamber stiffness constant ( $K_C$ ) was defined by the equation  $P = \alpha e^{\beta V} + P_0$ , where  $P_0$  is the pressure intercept at  $V = 0$  and  $\beta = K_C$ . The volume required to increase diastolic pressure from 0 to 15 mm Hg ( $V_{15}$ ) was measured as an index of LV compliance. Moreover, stress ( $\sigma$ ) and strain ( $\epsilon$ )

at LV midwall were calculated using the following equations (assuming LV to be a thin-walled sphere).

$$\sigma = [1.36 \times LVP \times LVV^{2/3}] / [(LVV + 0.943 \times LVW)^{2/3}] ;$$

$$\varepsilon = \{ [LVV^{1/3} + (LVV + 0.943 \times LVW)^{1/3}] / [V_0 + (V_0 + 0.943 \times LVW)^{1/3}] - 1 \} \times 100.$$

The myocardial chamber stiffness constant ( $K_M$ ) was then calculated as  $P = \sigma e^{\beta\varepsilon} + \sigma_0$ , where  $\sigma_0$  is the pressure intercept at  $\varepsilon = 0$  and  $\beta = K_M$  [20–22]. Strain<sub>15</sub> ( $\varepsilon_{15}$ ) corresponded to the diastolic strain caused by a stress of 15 g cm<sup>-2</sup>.

#### *In vitro analyses of mitochondrial functions*

Mitochondria were isolated from fresh LV tissue from two types of experimental groups: (1) SD and WKHA rats at 4 or 12 weeks after either sham or ACF surgery; and (2) SD rats with overt CHF and age-matched healthy SD. Mitochondrial functions were analyzed *in vitro* as described previously [23]. In brief, after performing basal ADP-restricted measurements ( $V_0$ ), 1 mmol/l ADP was added to measure the maximal rate of oxidative phosphorylation ( $V_{ADP}$ ) in presence of glutamate-malate (5:2.5 mmol/l). Respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio  $V_{ADP}/V_0$ . For anoxia-reoxygenation experiments, aliquots of mitochondria (2 mg of protein) were placed in an air-tight, temperature-controlled chamber. The organelles consumed all oxygen available in 5 min, anoxia was pursued for a further 20 min, and reoxygenation was produced by removing the sealed cap and allowing equilibration of the stirred mitochondrial suspension with room air. After 20 min of



reoxygenation, aliquots of the suspension were transferred in a second chamber for the assessment of mitochondrial respiratory function as described above. Experiments were performed in the absence and presence of the permeability transition pore (PTP) inhibitor cyclosporin A (CsA, 1  $\mu$ mol/l). For calcium challenges, aliquots of mitochondria were incubated at 22°C in buffer containing glutamate-malate (5:2.5 mmol/l). Changes in extra-mitochondrial calcium concentration were monitored using Calcium-green 5 N [23]. Calcium pulses (42 nmol/mg prot) were added at 2 min intervals until a  $\text{Ca}^{2+}$ -induced release of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  was observed. Calcium retention capacity (CRC) was taken as the total amount of  $\text{Ca}^{2+}$  accumulated by mitochondria prior to the  $\text{Ca}^{2+}$  pulse triggering  $\text{Ca}^{2+}$  release.

#### *Collagen concentration and solubility*

Fresh LV tissue was obtained from groups of SD and WKHA rats ( $n = 6/\text{group}$ ) sacrificed at 2, 4, and 8 weeks after either sham or ACF surgery. Collagen concentration and solubility were measured as published previously [24], with slight modifications. In short, LV tissue was rinsed in saline to remove erythrocytes, frozen and pulverized under liquid nitrogen. Aliquots of 200 mg of LV powder were then homogenized at 4°C in 3 ml of buffer containing Tris 7.5 50 mM, EDTA 5 mM, NaF 20 mM, and a cocktail of protease inhibitors. After centrifugation, the pellet was resuspended in 1.6 ml of 0.2 mg/ml pepsin in 0.5 M acetic acid, which was divided in 2 tubes containing 0.8 ml each and incubated at 37°C for either 2 or 24 h. At the end of the incubation with pepsin, the digestion was stopped by centrifugation, the supernatant was mixed to an equal volume of pure HCl, and the

samples were hydrolyzed by 20 h of incubation at 108°C. At the end of the hydrolysis, the samples were centrifuged one more time, the supernatant was neutralized by addition of 4 vol of NaOH 1 N, and collagen content was measured by quantitating the amount of hydroxyproline in each sample [25]. Total collagen corresponded to the quantity measured in the samples after 24 h of pepsin digestion. Collagen solubility was calculated as the collagen measured in the samples after 2 h of pepsin digestion, expressed as the percentage of total collagen.

### *Statistical analyses*

The effects of strains and surgical procedures on all variables were assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's corrected post hoc *t*-tests. Differences between survival curves were tested using a log-rank Mantel-Cox test.

## **RESULTS**

### *Post-operative mortality:*

Between the 10th and the 28th week after ACF surgery, SD rats developed lethal CHF at a continuous rate, so that 50% of the animals had developed lethal CHF after 23 weeks of VOL and only 36% of them remained alive after 39 weeks (Fig. 1). In contrast, 82% of operated male WKHA rats remained alive after the same period of time. These strain-dependent differences in survival were significant ( $P = 0.0023$ ), thus showing that VOL induced less mortality in male WKHA rats than in their SD counterparts.

*Hemodynamic and organ weight characteristics*

Hearts from WKHA and SD male rats were characterized at 2, 4, and 8 weeks after induction of ACF and compared to their sham-operated counterparts. Hemodynamic measurements are summarized in Table 1. LVESP was maintained during the whole period, and was not different between the 2 strains. The maximum rates of contraction and relaxation decreased from 2 to 8 weeks in both strains, but if anything, contractility was slightly more affected in WKHA, as the decrease in  $dP/dT$  was significant at all time-points in this strain only. Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) increased in both strains and to a similar extent starting from the 2 weeks time-point, but did not increase further at longer times. ACF also increased the normalized weight of both the LV and RV in a time-dependent fashion. Although the magnitude of the effect was similar in both strains for RV weight, ACF increased normalized LV weight significantly more in SD than in WKHA, despite the fact that it was lower in sham-operated SD than in their WKHA counterparts (Table 2). Normalized wet lung weight also increased progressively in both strains. The two-way ANOVA indicated that there was an overall significant effect of strain, with SD lung weight being higher than that from WKHA at all the time-points, and significantly so at 2 and 4 weeks after surgery. However, the interaction of strain with treatment was not significant, reflecting the fact that lung weight increased to the same proportion after ACF in both strains.

### *Cardiac morphology*

Morphometric measurements were performed on formalin-fixed hearts from SD and WKHA 4 weeks after either sham or ACF surgery (Fig. 2). In sham animals, cavity area was higher and RWT was lower in SD rats than in their WKHA counterparts. All the variables were affected by ACF but to a similar extent in both strains, so that there was no significant interaction of strain with treatment. However, cavity area after ACF remained larger in SD than in their WKHA counterparts.

### *Mitochondrial function:*

*In vitro* studies were performed on mitochondria isolated from the hearts of rats after 4 and 12 weeks of either sham or ACF surgery. Baseline respiratory functions in mitochondria from ACF animals [including basal ADP-restricted ( $V_0$ ), maximal ADP-stimulated ( $V_{ADP}$ ) respiration, RCR values] were not different (at both time-points and in both strains) from that of control sham animals (Table 3). At 4 and 12 weeks after ACF, 20 min of anoxia-reoxygenation *in vitro* reduced  $V_{ADP}$  to a greater extent than in mitochondria from sham-operated counterparts (except when the PTP inhibitor CsA was present during the experiment), but the magnitude of this effect of ACF on mitochondrial vulnerability was similar in both strains (Fig. 3). Mitochondrial vulnerability was further tested by measuring the sensitivity of isolated mitochondria to  $Ca^{2+}$ -induced opening of the PTP (Fig 4). In WKHA animals, no significant difference in calcium retention capacity (CRC) was observed between mitochondria from sham and ACF animals 4 weeks after surgery, but at 12 weeks, CRC was 35% lower in the ACF group. In contrast, the reduction in CRC induced by

the ACF was already observable at 4 weeks in SD rats, but did not increase in over time so that by 12 weeks, the reduction in CRC secondary to the ACF was of similar amplitude in both strains. Finally, baseline respiratory function ( $V_0$ ,  $V_{ADP}$ , and RCR) where not altered in mitochondria isolated from SD rats dying from CHF in comparison to healthy age-matched sham-operated counterparts, thus, providing no evidence that the sudden occurrence of CHF in SD rats could be due to a precipitous drop in mitochondrial function and myocardial energy supply (Table 3).

#### *Diastolic properties of LV cavity and chamber*

The diastolic chamber properties of LV from SD and WKHA sacrificed at 4 weeks after either sham or ACF surgery were calculated from the  $P/V$  curves performed on explanted hearts arrested in diastole. In sham-operated animals, the  $P/V$  curve of SD rats was shifted to the right compared to that of WKHA counterparts (Fig. 5). Accordingly, the distensibility (or compliance) of the LVs from SD ( $V_{15}$ ) was slightly (although not significantly) greater, meaning that the LV accommodated a larger volume for a given filling pressure. The ACF caused a shift to the right of the  $P/V$  curve in both strains and an increase of  $V_{15}$ . The latter increased more in SD than in WKHA, so that the  $V_{15}$  of SD became significantly higher than that of WKHA after ACF. The slopes of the  $P/V$  relationships (which correspond to the chamber stiffness constant  $K_C$ ) were similar in all groups, but tended to decrease after ACF and to a greater extent in WKHA.

In contrast to the properties of the LV chamber, LV wall properties (calculated from the stress–strain curves) differed to a greater extent between experimental groups. In sham-operated animals, the stress/strain curve of SD rats was shifted to the left compared to that of WKHA counterparts (Fig. 6). Accordingly, the  $\epsilon_{15}$  value of LVs from SD rats tended to be lower than in WKHA rats, meaning that a smaller degree of stretch was needed to induce a given level of stress within the wall. The ACF caused a shift to the left of the stress/strain curve, so that  $\epsilon_{15}$  decreased in both strains of rats, but only significantly so in SD. The slopes of the stress–strain curves (which corresponds to the myocardial wall stiffness constant  $K_M$ ) were higher in SD than in WKHA both in sham and ACF animals, and ACF increased  $K_M$  to a greater extent in SD than in their WKHA counterparts, so that strain interacted significantly with the effect of ACF.

#### *Collagen concentration and cross-linking*

Comparisons of total collagen concentration in LV from SD and WKHA at all times after either sham or ACF surgery revealed that there was an overall significant effect of strain, meaning that, taken together, total collagen was lower in LV from SD rats (Fig. 7). ACF increased the % of cross-linked collagen in a time-dependent fashion and to the same extent in both strains. However, this also meant that the absolute amount of cross-linked collagen was lower in SD across all the time-points than in their WKHA counterparts.

## DISCUSSION

In experimental animals, VOL has been reported to have several detrimental effects on the myocardium, each of which possibly contributing to the transition to CHF. At the whole organ level, VOL (in addition to inducing eccentric remodeling) increases oxygen consumption, decreases cardiac efficiency, impairs subendocardial blood flow, causes abnormal myocardial bioenergetics, and increases the risk of ventricular arrhythmias [26–28]. VOL also affects extracellular matrix turnover [10, 29], mitochondrial vulnerability [23] and recruitment and activation of several types of inflammatory cells [30, 31]. While all these events develop in a matter of days or weeks after induction of VOL, eventual mortality by CHF occurs only several months later, and it is not known to which extent such late events can be predicted on the basis of the severity of the early responses.

Although ACF had rapid effects on the functional, morphologic, and physical properties of myocardial walls in both strains, our main finding related to the fact that normalized LV weight, LV cavity area, and myocardial wall stiffness were the only variables that were affected to a greater extent in the mortality-prone SD strain. In contrast, there were only marginal strain-related differences in the way ACF affected hemodynamic and mitochondrial functions. These results are similar to data obtained in patients, where (1) a correlation could be established between heart dilatation and the risk of CHF [32], and (2) heart dilatation was found to be a better predictor of CHF than hemodynamic dysfunction [28]. These correlations had allowed others to suggest that cardiac remodeling does not constitute just a consequence of overload

but may contribute by itself to heart failure progression [26, 28]. However, it was not possible on the basis of these retrospective observations to determine whether cardiac remodeling was a bystander correlate of severe cardiopathy, or whether it could contribute (especially at early times during the course of cardiopathy) to increased risk of transition to cardiac decompensation. By using two distinct strains of rats whose susceptibility to late mortality by sudden CHF could be predicted on the basis of their different genetic backgrounds, we obtained evidence that early remodeling events could indeed predict whether congestive heart failure will occur at later times.

In pressure overload, there is accumulation of collagen protein, with concomitant fibrosis that can interfere with ventricular performance [33]. In contrast, VOL does not cause fibrosis at the stage of compensated hypertrophy (although there may be upregulation of collagen gene expression) [34]. However, one should also consider collagen cross-linking in addition to just collagen concentration, since increased collagen cross-linking causes myocardial stiffness [21], whereas decreased cross-linking parallels LV dilatation in models of systolic dysfunction [35]. Although there is no fibrosis in VOL-compensated hypertrophy, this condition may lead to an increase in collagen cross-linking [36]. Accordingly, we confirmed ourselves that VOL indeed increased collagen cross-linking in a time-dependent fashion, but by a similar proportion in both strains. However, the final consequence of these observations is that total and cross-linked collagen were both lower at all times after ACF in SD than in WKHA. Although increased collagen and fibrosis may be detrimental, increased degradation by metalloproteases may have deleterious consequences as well, as it has been shown to associate to ventricular dilatation in



several situations, such as after dissolution of the collagen matrix by injection of disulfide reagents [37], at early times after the onset of VOL [12, 29], or in dilated cardiomyopathies during end-stage CHF, such as in rapid ventricular pacing in the dog or in some idiopathic human dilated cardiomyopathies [33, 38]. It is intriguing to speculate that the lower concentrations of total and cross-linked collagen found in SD under basal conditions could relate to differences in LV cavity size even prior to the occurrence of pathologic situations, and thus constitute risk factors by which differences in genetic background could lead to greater susceptibility to dilated cardiomyopathy.

There is an important inter-individual variability in humans with LV VOL (caused for instance by mitral or aortic regurgitation) in terms of progression of LV remodeling and dysfunction [39, 40]. Thus, for any given degree of volume overload, some patients have no or minimal changes in LV geometry and function, whereas others have a rapid and often irreversible deterioration of LV geometry and function. Such inter-individual or inter-racial variability is usually attributed to differences in natural genetic variation. Inbred rodent strains are useful tools in this regard, since they show genetic and phenotypic variations that mimic and capture the phenotypic diversity characteristic of human populations [41]. The differences found between the genetically distinct SD and WKHA rats thus suggest that differences in genetic background may greatly influence the susceptibility to dilated cardiopathy in response to VOL and this may translate into important differences in terms of survival. Although it is still not possible in the clinical setting to identify the patients who have a genetic predisposition to nonfamilial forms of dilated cardiopathy (and thus have

increased cardiac risk), our finding also reinforce the utility of a close echocardiographic follow-up of LV geometry and function. Although indices of LV systolic function markedly underestimate the extent of myocardial impairment in the presence of some volume overload cardiopathies such as mitral regurgitation [42], dilation of the LV is currently the main criteria presented in the clinical guidelines to recommend surgery in patients with mitral or aortic regurgitation [43]. This is in keeping with the finding of this study, which also shows that in addition to LV cavity size, there are also marked differences in terms of how VOL affects the stress-strain relationships in the LV walls of both strains. So far, only a handful of reports have suggested that measurements of myocardial strain by recently developed echocardiographic modalities (such as speckle tracking) may be useful to detect subclinical LV dysfunction [44, 45]. Moreover, since the most frequent cause of LV volume overload is mitral regurgitation, other more frequently used indices based on mitral flow velocities measured by Doppler are not applicable. However, speckle tracking imaging is a methodology that is still in development [46], and additional studies are needed to determine whether myocardial strain measured by such techniques could improve the detection of diastolic myocardial dysfunction, and thereby enhance risk stratification in patients with volume overload cardiopathies.

Of note, we did not study the exact cause of sudden cardiac death in the animals with VOL. Although the increase in LV volume that develops quickly after induction of ACF is a necessary adaptation that allows the heart pump to accommodate the greater volume imposed by VOL, it is known that the relationship between stroke volume and LV volume is not infinitely linear, but is rather an inverse

U-shaped curve where stroke volume decreases once LV volume reaches a critical maximal value [27]. Likewise, while force development by striated muscle increases linearly when muscle stretch increases the length of sarcomeres from 1.8 to 2.2  $\mu\text{m}$ , a physical limit is reached when sarcomere length is greater than 2.2  $\mu\text{m}$ , at which point muscle work production drops precipitously [47, 48]. There may, thus, be a maximal absolute level of stretch and dilatation beyond which optimal pump performance can no longer be maintained because of physical limitations, with SD rats reaching that limit earlier than WKHA rats. Alternatively, ventricular dilatation is known to be accompanied by extensive electric remodeling, which can contribute to cardiac arrest by increasing the susceptibility to arrhythmias [49].

In conclusion, the early morphologic responses of LV walls to ACF appear to constitute good predictors of adverse outcome in the presence of sustained VOL, whereas the early effects of ACF on myocardial hemodynamic and mitochondrial functions correlate poorly with the effect of ACF on mortality. These manifestations might constitute one of the ways by which the genetic background may influence the rapidity by which dilated cardiopathy develops in response to VOL. As LV dilatation has important downstream consequences on myocardial diastolic wall stress, new methods that make it possible to analyze myocardial diastolic strain may provide new promising avenues to further improve risk stratification in volume overload cardiopathies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants MOP-74460 and MOP-62694 from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). YB is a Junior II Investigator of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We acknowledge the contribution of the FRSQ Cardiovascular Health Network for the ACF surgeries and follow-up hemodynamic investigations.

## REFERENCES

1. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003; 65:45-79.
2. Mann DL. Basic mechanisms of left ventricular remodeling: the contribution of wall stress. *J Card Fail* 2004; 10:S202-S206.
3. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy. Pathogenesis, detection and prognosis. *Circulation* 2000; 102:470-9.
4. Carabello BA. The current therapy for mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:319-26.
5. Ling LH, Enriquez-Sarano M, Seward JB, et al. Clinical outcome of mitral regurgitation due to flail leaflet. *N Engl J Med* 1996; 335:1417-23.
6. Enriquez-Sarano M, Avierinos JF, Messika-Zeitoun D, Detaint D, Capps M, Nkomo V, Scott C, Schaff HV, Tajik AJ. Quantitative determinants of the outcome of asymptomatic mitral regurgitation. *N Engl J Med* 2005; 352:875–883
7. Grigioni F, Enriquez-Sarano M, Ling LH, et al. Sudden death in mitral regurgitation due to flail leaflet. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:2078-85.
8. Otto CM. Timing of surgery in mitral regurgitation. *Heart* 2003; 89:100-5.
9. Liao Y, Ishikura F, Beppu S, et al. Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation. *Am J Physiol* 2002; 282:H1703-H1708.
10. Dolgilevich SM, Siri FM, Atlas SA, Eng C. Changes in collagenase and collagen gene expression after induction of aortocaval fistula in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281:H207-H214.

11. Brower GL, Chancey AL, Thanigaraj S, Matsubara BB, Janicki JS. Cause and effect relationship between myocardial mast cell number and matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H518-H525.
12. Ryan TD, Rothstein EC, Aban I, et al. Left ventricular eccentric remodeling and matrix loss are mediated by bradykinin and precede cardiomyocyte elongation in rats with volume overload. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:811-21.
13. Brower GL, Henegar JR, Janicki JS. Temporal evaluation of left ventricular remodeling and function in rats with chronic volume overload. *Am J Physiol* 1996; 271:H2071-H2078.
14. Brower GL, Janicki JS. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol* 2001; 280:H674-H683.
15. Wang X, Ren B, Liu S, Sentex E, Tappia PS, Dhalla NS. Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. *J Appl Physiol* 2003; 94:752-63.
16. Matas J, Marcil M, Ascah A, Deschepper CF, Burelle Y. Implication of Cyclophilin-D and the Mitochondrial Permeability Transition Pore in Mitochondrial Vulnerability of Compensated Myocardial Hypertrophy (abstr). *FASEB J* 2008;22:751.7.
17. Souzeau E, Belanger S, Picard S, Deschepper CF. Dietary isoflavones during pregnancy and lactation provide cardioprotection to offspring rats in adulthood. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H715-H721.
18. Deschepper CF, Picard S, Thibault G, Touyz R, Rouleau JL. Characterization of left ventricular myocardium, isolated cardiomyocytes and blood pressure in WKHA and WKY rats. *Am J Physiol* 2002; 82:H149-H155.
19. Borlaug BA, Kass DA. Mechanisms of diastolic dysfunction in heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16:273-9.
20. Watanabe S, Shite J, Takaoka H, et al. Myocardial stiffness is an important determinant of the plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with both diastolic and systolic heart failure. *Eur Heart J* 2006; 27:832-8.
21. Norton GR, Tsotetsi J, Trifunovic B, Hartford C, Candy GP, Woodiwiss AJ. Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 1997; 96:1991-8.
22. De Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial dysfunction with increased ventricular compliance in volume overload hypertrophy. *Eur J Heart Fail* 2006; 8:784-9.
23. Marcil M, Ascah A, Matas J, Belanger S, Deschepper CF, Burelle Y. Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41:998-1009.

24. Liu J, Masurekar MR, Vatner DE, et al. Glycation end-product cross-link breaker reduces collagen and improves cardiac function in aging diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H2587-H2591.
25. Brown S, Worsfold M, Sharp C. Microplate assay for the measurement of hydroxyproline in acid-hydrolyzed tissue samples. *Biotechniques* 2001; 30:42-8.
26. Cohn JN. Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation* 1995; 91:2504-7.
27. Jacob R, Gulch RW. The functional significance of ventricular geometry for the transition from hypertrophy to cardiac failure. Does a critical degree of structural dilatation exist? *Basic Res Cardiol* 1998; 93:423-9.
28. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure. The biochemical model and beyond. *Circulation* 2005; 111:2837-49.
29. Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Chancey AL, Stewart JA, Jr. The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling. *Heart Fail Rev* 2004; 9:33-42.
30. Behr TM, Wang X, Aiyar N, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated in rats with volume-overload congestive heart failure. *Circulation* 2000; 102:1315-22.
31. Chancey AL, Brower GL, Janicki JS. Cardiac mast cell-mediated activation of gelatinase and alteration of ventricular diastolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H2152-H2158.
32. Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Levy D. Left ventricular dilatation and the risk of congestive heart failure in people without myocardial infarction. *N Engl J Med* 1997; 336:1350-5.
33. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26:279-92.
34. Namba T, Tsutsui H, Tagawa H, et al. Regulation of fibrillar collagen gene expression and protein accumulation in volume-overloaded cardiac hypertrophy. *Circulation* 1997; 95:2448-54.
35. Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, et al. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* 2001; 103:155-60.
36. Iimoto DS, Covell JW, Harper E. Increase in cross-linking of type I and type III collagens associated with volume-overload hypertrophy. *Circ Res* 1988; 63:399-408.
37. Caulfield JB, Norton P, Weaver RD. Cardiac dilatation associated with collagen alterations. *Mol Cell Biochem* 1992; 118:171-9.

38. Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res* 2000; 46:225-38.
39. Avierinos JF, Detaint D, Messika-Zeitoun D, Mohty D, Enriquez-Sarano M. Risk, determinants, and outcome implications of progression of mitral regurgitation after diagnosis of mitral valve prolapse in a single community. *Am J Cardiol* 2008; 101:662-667
40. Enriquez-Sarano M, Basmadjian AJ, Rossi A, Bailey KR, Seward JB, Tajik AJ. Progression of mitral regurgitation: a prospective Doppler echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:1137-1144
41. Svenson KL, Von SR, Magnani PA, Suetin HR, Paigen B, Naggert JK, Li R, Churchill GA, Peters LL. Multiple trait measurements in 43 inbred mouse strains capture the phenotypic diversity characteristic of human populations. *J Appl Physiol* 2007; 102:2369-2378
42. Lee R, Marwick TH. Assessment of subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic mitral regurgitation. *Eur J Echocardiogr* 2007; 8:175-184
43. Bonow RO, Carabello BA, Kanu C, de Leon AC Jr, Faxon DP, Freed MD, Gaasch WH, Lytle BW, Nishimura RA, O'Gara PT, O'Rourke RA, Otto CM, Shah PM, Shanewise JS, SC Smith Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Lytle BW, Nishimura R, Page RL, Riegel B. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists: endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *Circulation* 2006; 114:e84-231
44. Edvardsen T, Skulstad H, Aakhus S, Urheim S, Ihlen H. Regional myocardial systolic function during acute myocardial ischemia assessed by strain Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:726-730
45. Lee R, Hanekom L, Marwick TH, Leano R, Wahi S. Prediction of subclinical left ventricular dysfunction with strain rate imaging in patients with asymptomatic severe mitral regurgitation. *Am J Cardiol* 2004; 94:1333-1337
46. Marwick TH, Leano RL, Brown J, Sun JP, Hoffman R, Lysyanski P, Becker M, Thomas JD. Myocardial strain measurements with 2-dimensional speckle-tracking echocardiography. *J Am Coll Cardiol Img* 2009; 2:80-84
47. Layland J, Young IS, Altringham JD. The length dependence of work production in rat papillary muscles *in vitro*. *J Exp Biol* 1995; 198:2491-2499
48. Kentish JC, Stienen GJ. Differential effects of length on maximum force production and myofibrillar ATPase activity in rat skinned cardiac muscle. *J Physiol* 1994; 475:175-184
49. Petkova-Kirova PS, Gursoy E, Mehdi H, McTiernan CF, London B, Salama G. Electrical remodeling of cardiac myocytes from mice with heart failure due to the overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H2098-H2107

**Table 1: Hemodynamic values after sham or ACF surgery**

	LVESP		dp/dt min		dp/dt max		delta LVDP		tau	
	SD	WKHA	SD	WKHA	SD	WKHA	SD	WKHA	SD	WKHA
Sham operated	116.0 (9.3)	115.5 (8.6)	-6729.3 (666)	-6591.9 (726)	5737.6 (736)	6563.8 (957)	6.3 (1.7)	5.7 (1.2)	11.14 (0.68)	10.9 (0.28)
2 weeks ACF (abs.)	113.9 (4.6)	117.9 (8.7)	-5824.3 (679)	-5570.3 (808) <sup>c</sup>	5789.0 (1271)	5085.8 (760) <sup>c</sup>	11.8 (2.3)	11.9 (2)	9.74 (1.07) <sup>s</sup>	12.16 (1.4)
2 weeks (% sham)	<b>98.21%</b>	<b>102.08%</b>	<b>86.55%</b>	<b>84.50%</b>	<b>100.90%</b>	<b>77.48%</b>	<b>189.11%</b>	<b>209.25%</b>	<b>87.45%</b>	<b>111.75%</b>
4 weeks ACF (abs.)	120.2 (2.5)	118.9 (16.2)	-5752.2 (889)	-5290.5 (967) <sup>c</sup>	4895.6 (1001)	4891.6 (1477) <sup>c</sup>	13.5 (1.6)	11.8 (3)	10.79 (1.66) <sup>s</sup>	13.53 (1.78) <sup>c</sup>
4 weeks (% sham)	<b>103.62%</b>	<b>102.91%</b>	<b>85.48%</b>	<b>80.26%</b>	<b>85.33%</b>	<b>74.52%</b>	<b>215.05%</b>	<b>207.55%</b>	<b>96.91%</b>	<b>124.31%</b>
8 weeks ACF (abs.)	117.3 (5.1)	111.2 (6.7)	-5141.3 (898) <sup>c</sup>	-4592 (481) <sup>c</sup>	4901 (829)	4203 (757) <sup>c</sup>	9.6 (3.2)	10.4 (2.4)	12.13 (1.75)	13.05 (1.5) <sup>c</sup>
8 weeks (% sham)	<b>101.15%</b>	<b>96.3%</b>	<b>76.40%</b>	<b>69.7%</b>	<b>85.42%</b>	<b>64%</b>	<b>152.70%</b>	<b>184%</b>	<b>108.90%</b>	<b>119.9%</b>
strain effect	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		P < 0.01	
treatment effect	n.s.		P < 0.0001		P < 0.0003		P < 0.0001		P < 0.01	
interaction	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		P < 0.001	

Absolute values are mean (SD), n = 6-8. Values in bold correspond to the % of mean value from sham-operated animals of the same strain. <sup>c</sup> P < 0.01 vs control sham-operated rat from the same strain (by Bonferroni-corrected post-hoc test). <sup>s</sup> P < 0.01 vs. the animal of the other strain at the same time after surgery (by Bonferroni-corrected post-hoc test). Results of the 2 way-ANOVA analysis are indicated at the bottom of the table.



**Table 2: Morphologic values after sham or ACF surgery**

	LV/tibia		RV/tibia		lung/tibia	
	SD	WKHA	SD	WKHA	SD	WKHA
Sham operated	16.04 (0.87) <sup>s</sup>	20.37 (1.55)	4.33 (0.19)	4.41 (0.47)	3.64 (0.28)	3.33 (0.1)
2 weeks AVF (absolute)	24.91 (1) <sup>c</sup>	25.71 (2.02) <sup>c</sup>	6.44 (0.57)	6.37 (0.68)	4.74 (0.35) <sup>s</sup>	4.08 (0.57)
2 weeks (% sham)	<b>155.27%</b>	<b>126.26%</b>	<b>148.58%</b>	<b>144.56%</b>	<b>136.33%</b>	<b>122.44%</b>
4 weeks AVF (absolute)	32.9 (2.83) <sup>c, s</sup>	29.7 (1.37) <sup>c</sup>	7.8 (1.6)	8.3 (0.97)	4.9 (0.43)	4.6 (0.55)
4 weeks (% sham)	<b>204.91%</b>	<b>145.65%</b>	<b>179.58%</b>	<b>187.63%</b>	<b>135.42%</b>	<b>137.74%</b>
8 weeks AVF (absolute)	37.32 (3.34) <sup>c, s</sup>	33.68 (1.54) <sup>c</sup>	9.30 (1.7)	10.11 (0.88)	6.13 (1) <sup>s</sup>	5.29 (0.76)
8 weeks (% sham)	<b>232.63%</b>	<b>165.36%</b>	<b>214.49%</b>	<b>229.53%</b>	<b>168.35%</b>	<b>158.81%</b>
strain effect	n.s.		n.s.		p < 0.0001	
treatment effect	p < 0.0001		p < 0.0001		p < 0.0001	
interaction	p < 0.0001		n.s.		n.s.	

Absolute values are mean (SD, n = 6-8. Values in bold correspond to the % of mean value from sham-operated animals of the same strain. <sup>c</sup> P < 0.01 vs control sham-operated rat from the same strain (by Bonferroni-corrected post-hoc test). <sup>s</sup> P < 0.01 vs. the animal of the other strain at the same time after surgery (by Bonferroni-corrected post-hoc test). Results of the 2 way-ANOVA analysis are indicated at the bottom of the table.

**Table 3: Baseline mitochondrial respiratory functions**

Group	Condition	SD		WKHA	
		Sham	ACF	Sham	ACF
4 weeks	$V_0$	21.3 (7.1)	23.3 (4.8)	20.6 (4.1)	24.2 (3.6)
	$V_{ADP}$	133.1 (33.3)	156.6 (24.7)	158.6 (32.2)	140.8 (61)
	RCR	6.2 (0.5)	6.7 (0.5)	7.7 (0.3)	7.6 (0.2)
12 weeks	$V_0$	30.5 (7.6)	29.1 (5.4)	25.6 (4.5)	25.8 (4.1)
	$V_{ADP}$	182.3 (23.2)	220.2 (68.0)	130.1 (31.9)	153.3 (3.1)
	RCR	6.4 (1.1)	7.4 (1.7)	5.1 (0.8)	6.0 (0.7)
HF	$V_0$	32 (6)	32 (3.2)	n.a.	n.a.
	$V_{ADP}$	168 (30)	184 (32)	n.a.	n.a.
	RCR	5.4 (0.2)	5.6 (0.8)	n.a.	n.a.

Values are means (SD,  $n = 8-12$  for most groups, except for WKHA after 4 weeks ( $n = 3$ ) and SD in heart failure (HF) and their sham counterparts ( $n = 4$  in each group). All the measurements are performed in mitochondria energized with glutamate:malate (5:2.5 mM).  $V_0$  and  $V_{ADP}$  are expressed as nmole  $O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ , and RCR as the  $V_0/V_{ADP}$  ratio. Values formatted in italics were obtained with an electrode that was different from the one used for other experimental groups, thus, yielding absolute values that were slightly but consistently higher than the ones obtained with the first electrode

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1:** Kaplan–Meier survival curves in male SD and WKHA following ACF surgery. The strain-dependent differences in survival were significant ( $P = 0.0023$ ) when tested by a log-rank test.

**Fig. 2: Morphologic characteristics of LVs from male SD and WKHA 4 weeks after either sham or ACF surgery.** Values are means (SD),  $n = 6$  per group.  $c^*$  and  $c^{***}$ :  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. control sham, respectively;  $s^{**}$  and  $s^{***}$ :  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$  vs. similarly operated animal from other strain, respectively

**Fig. 3: Effect of ACF on susceptibility to anoxia-reoxygenation injury.**  $V_{ADP}$  respiration was measured before (baseline) and after 20 min of anoxia and 20 min of reoxygenation in SD (**a** and **b**) and WKHA (C and D) rats at 4 weeks (**a** and **c**) or 12 weeks (**b** and **d**) post surgery. Experiments were carried out in presence or absence of 1  $\mu$ M cyclosporin A (CsA) added before anoxia. Values are mean (SD) for  $n = 6$ –9 except in the WKHA 4 weeks group ( $n = 3$ ).  $^c P < 0.05$  vs. control sham-operated;  $^b P < 0.05$  vs. baseline

**Fig. 4: Effect of ACF on the sensitivity to  $Ca^{2+}$ -induced PTP opening.** Typical recordings of  $Ca^{2+}$  kinetics in mitochondria from sham (**a**) and ACF (**b**) hearts energized with glutamate:malate (5:2.5 mM). Each arrow represents the addition of a single  $Ca^{2+}$  pulse of 42 nmol/mg prot. **c** presents values of  $Ca^{2+}$  retention capacity (CRC) observed in mitochondria from ACF animals from the SD (■) and WKHA (□) strains relative to their sham counterparts at 4 and 12 weeks post surgery. Values are

mean (SD) for  $n = 6$ – $12$  except in the WKHA 4 weeks group ( $n = 3$ ). <sup>c</sup>  $P < 0.05$  vs. control sham-operated

**Fig. 5. Diastolic chamber properties of LV from SD and WKHA** (sacrificed at 4 weeks after either sham or ACF surgery). **a**  $P/V$  curves, both at baseline and after ACF; the curves of SD rats are shifted to the right compared to their WKHA counterparts; each point represents mean  $\pm$  SE; **b** the values represent the mean values of  $V_{15}$  (as calculated on curves from each individual animal)  $\pm$ SD; c\*\*\*:  $P < 0.001$  vs. control sham; c\*\*:  $P < 0.01$  vs. control sham; s\*\*:  $P < 0.01$  vs. similarly operated animal from other strain. **c** the values represent the mean values of  $K_C$  (as calculated on curves from each individual animal)  $\pm$ SD; c\*:  $P < 0.05$  vs. control sham

**Fig. 6. Diastolic myocardial wall properties of LV from SD and WKHA** (sacrificed at 4 weeks after either sham or ACF surgery). **a** stress–strain curves, both at baseline and after ACF; the curves of SD rats are shifted to the left compared to their WKHA counterparts; each point represents mean  $\pm$  SE; **b** the values represent the mean values of strain<sub>15</sub> (as calculated on curves from each individual animal)  $\pm$ SD; s\*\*:  $P < 0.01$  vs. similarly operated animal from other strain. **c** the values represent the mean values of  $K_M$  (as calculated on curves from each individual animal)  $\pm$ SD; c\*\*\*:  $P < 0.001$  vs. control sham; c\*\*:  $P < 0.01$  vs. control sham; s\*\*\*:  $P < 0.001$  vs. similarly operated animal from other strain

**Fig. 7: Abundance of total and nonsoluble (i.e., cross-linked) collagen**, expressed as either absolute values or % of total collagen, in LV from SD and WKHA after 2, 4, and 8 weeks of either ACF or sham surgery. Values are mean (SD) with  $n = 6$  per

group. The two-way ANOVA revealed that the absolute concentrations of total and nonsoluble were in general higher in SD than in WKHA rats. However, the only difference found significant by the Bonferroni-corrected t-test at individual time-points was that concerning total collagen in sham-operated animals

Figure 1

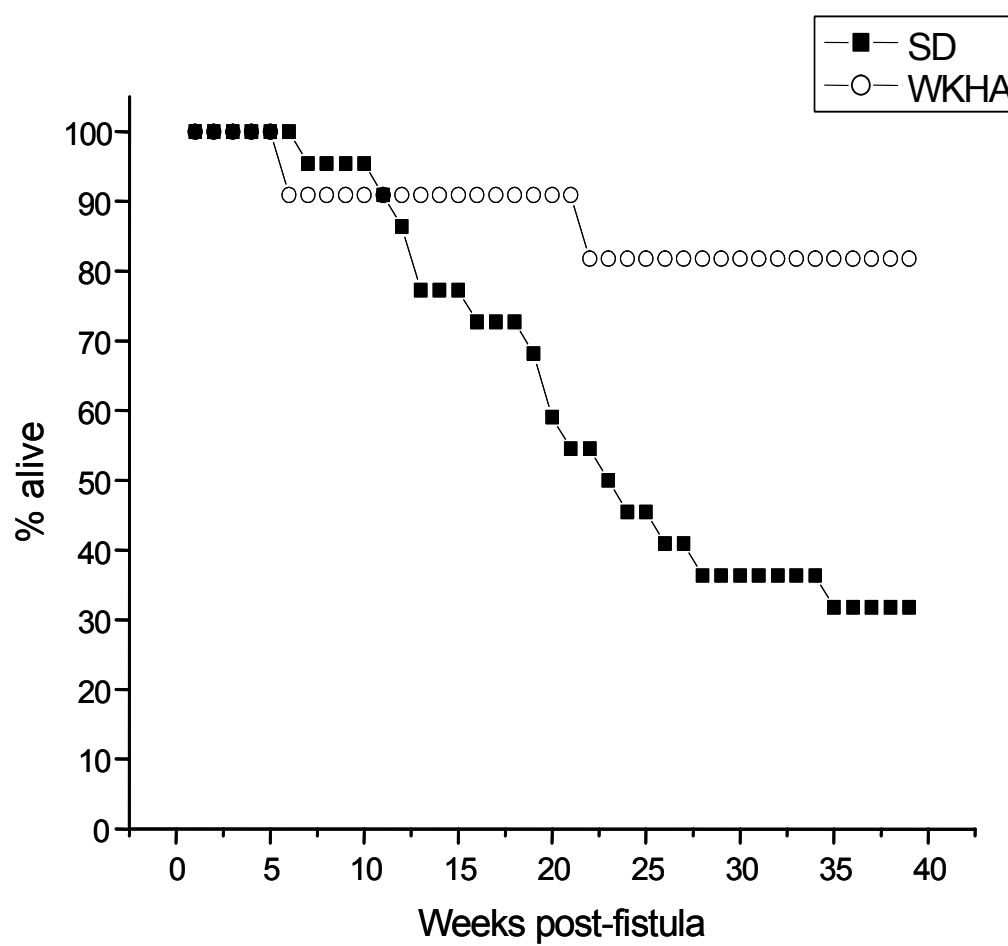


Figure 2

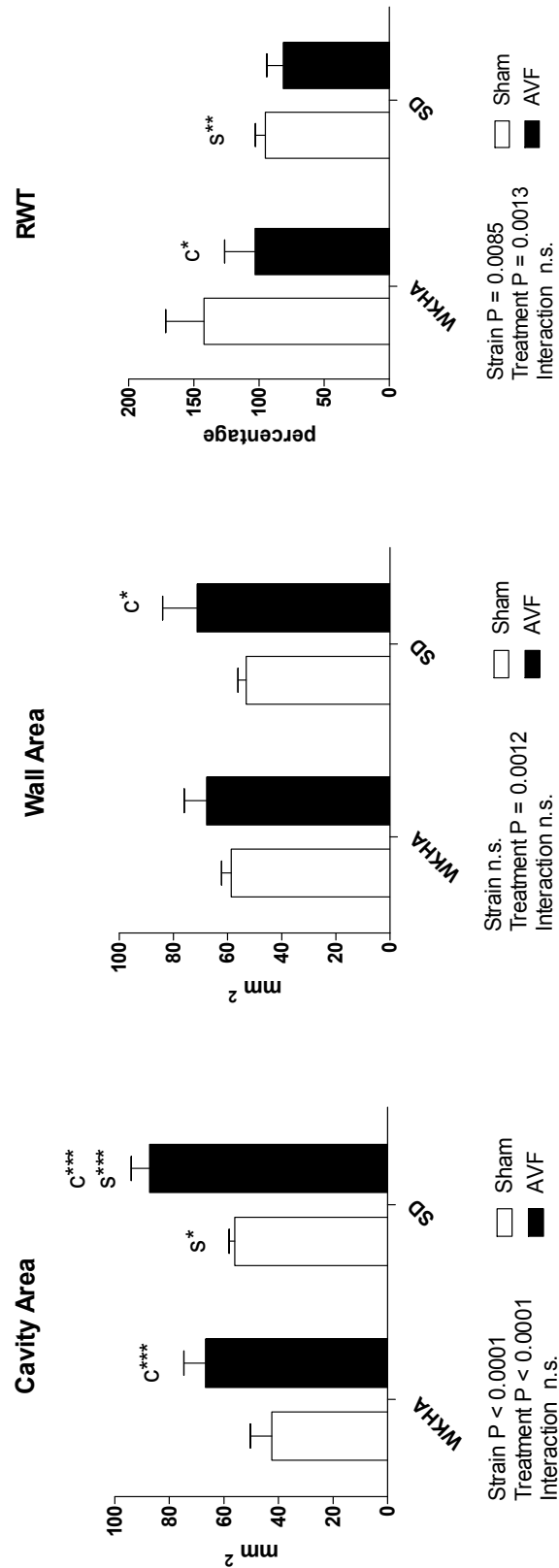


Figure 3

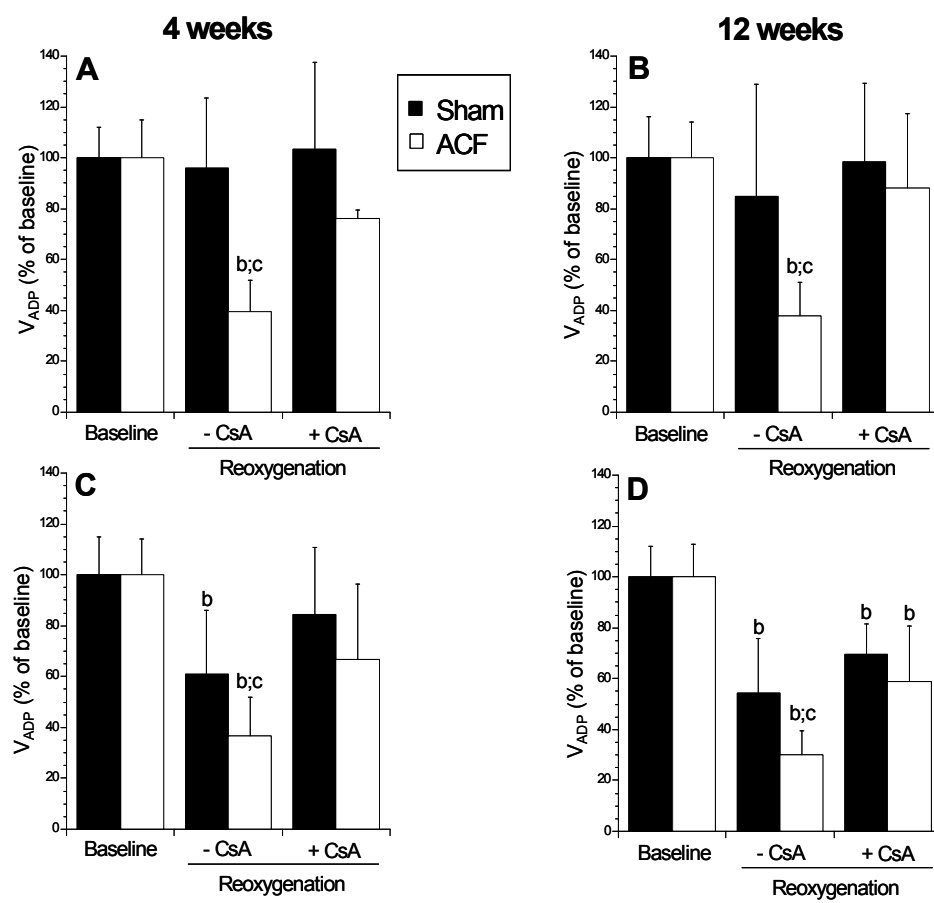




Figure 4

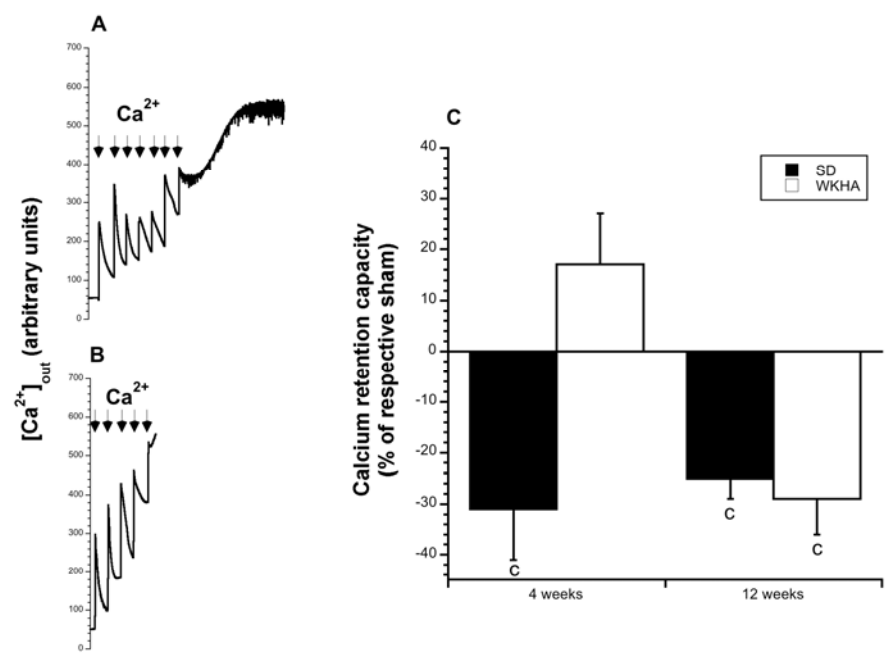


Figure 5

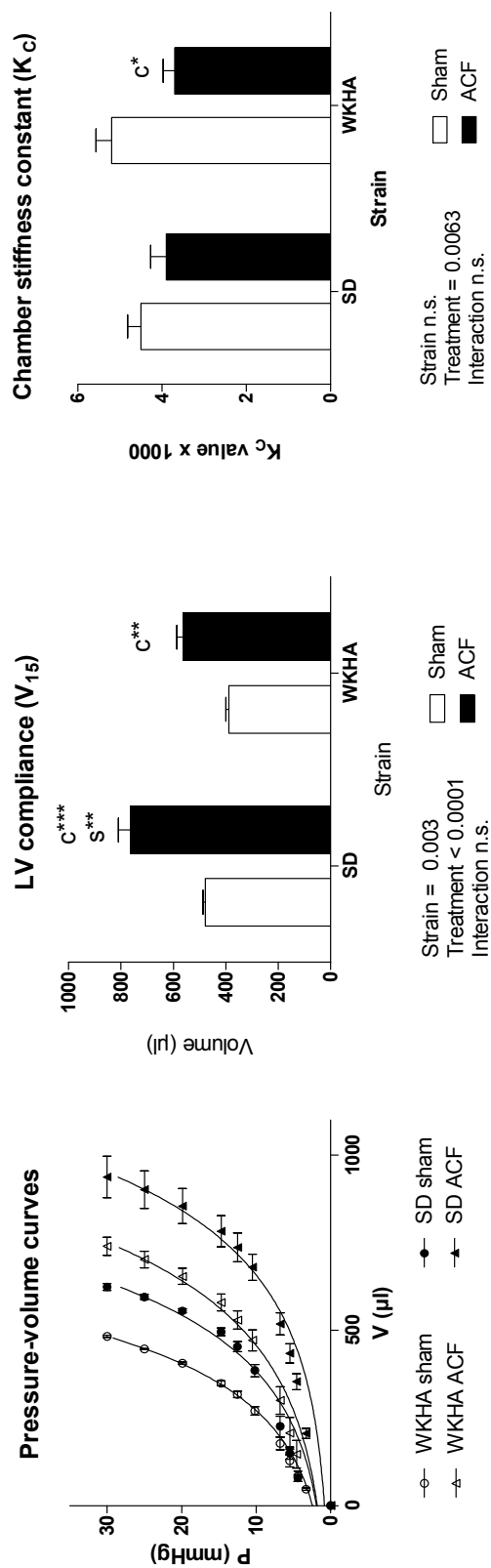


Figure 6

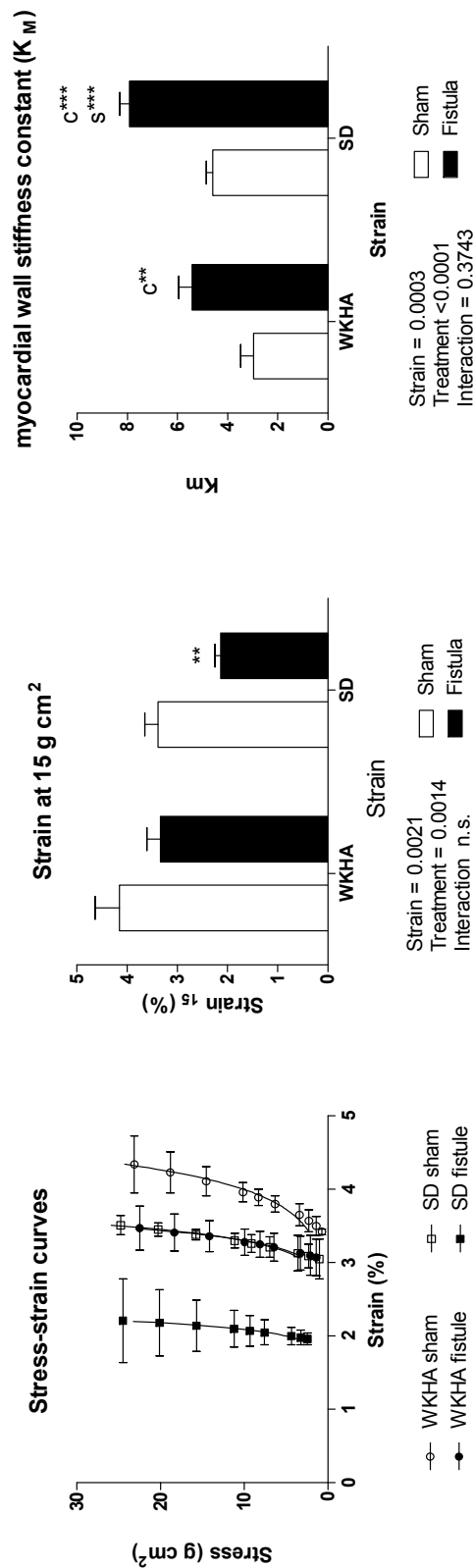
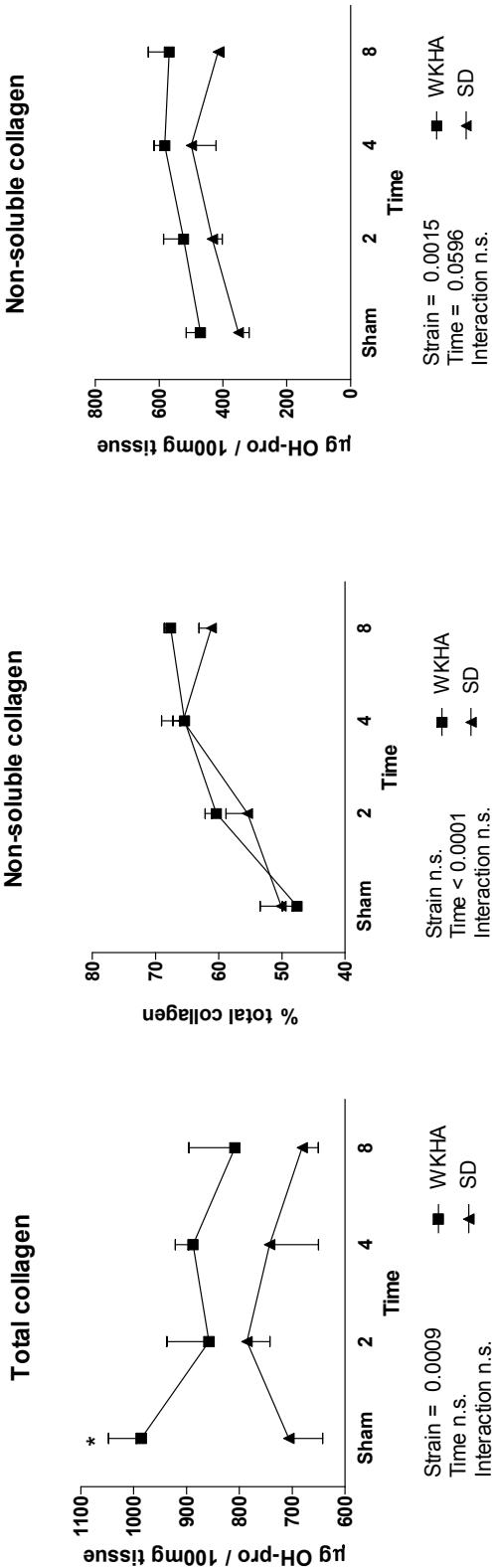
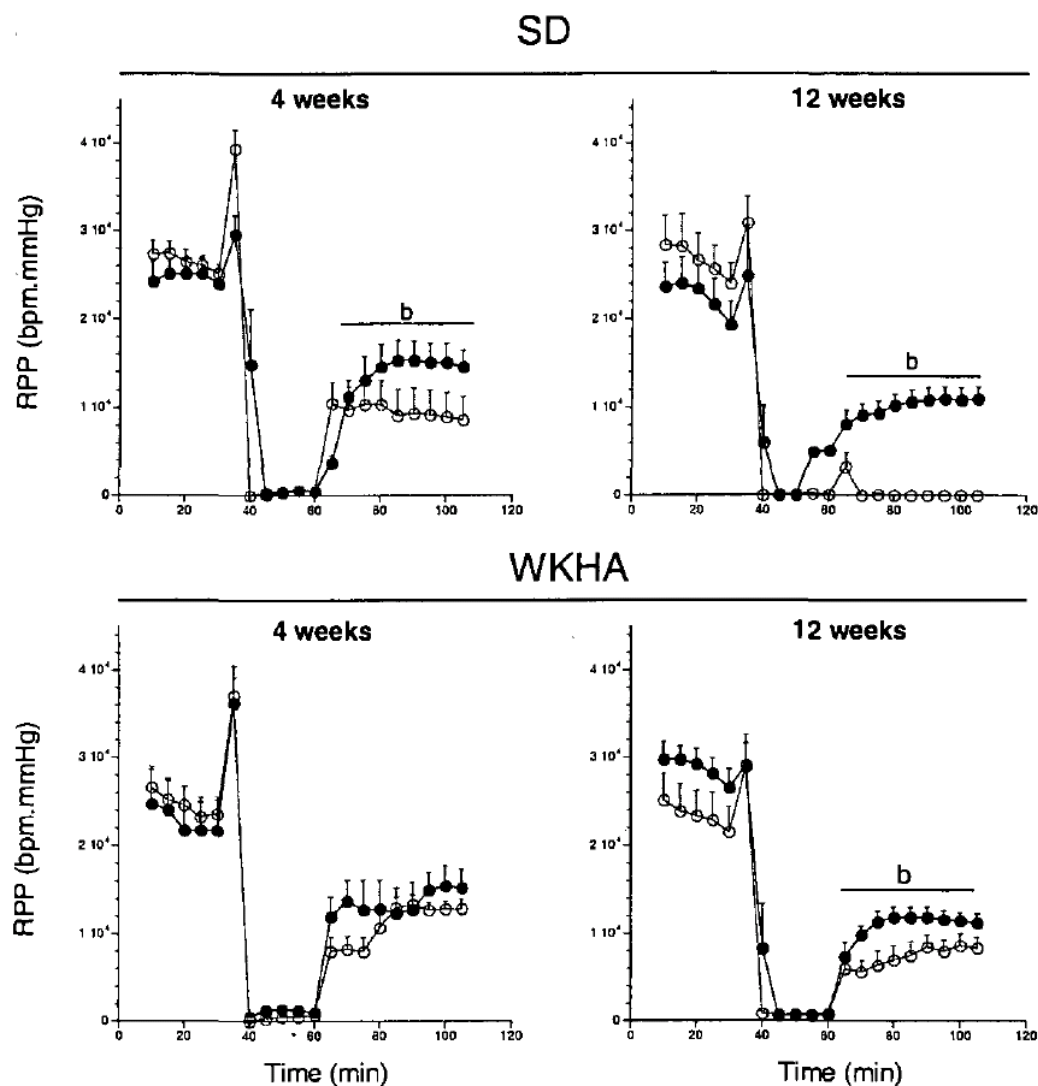


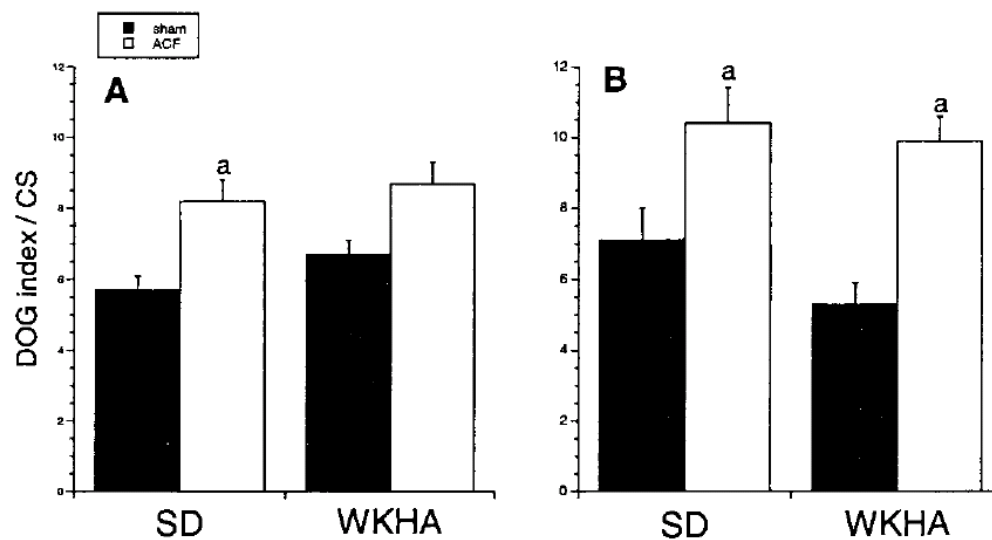
Figure 7



## Annexe



**Effect of ACF on rate-pressure product during ischemia and reperfusion.** The figure shows the evolution of rate-pressure product in sham (●) and ACF (○) hearts submitted to low flow ischemia in presence of adrenergic stress in SD and WKHA rats at 4 and 12 weeks post-surgery. Values are mean  $\pm$  SEM for  $n = 6-11$ . b: significantly different than ACF  $p < 0.05$ .



**Mitochondrial [ $^3\text{H}$ ]-DOG entrapment in sham and ACF rats after I-R** The figure shows the DOG index normalised for the activity of citrate synthase (CS) recovered in the mitochondrial fraction isolated after reperfusion per g. of ventricular tissue of sham (■) and ACF (□) animals at 4 (Panel A) and 12 (Panel B) weeks post-surgery. Values are mean  $\pm$  SEM for  $n = 6-11$ . a Significantly different from sham  $p < 0.05$

## 5.2 Article 2

### Titre

Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: Lessons from the dystrophic heart

### Auteurs

Yan Burelle, Maya Khairallah, Alexis Ascah, Bruce G. Allen, Christian F. Deschepper, Basil J. Petrof, Christine Des Rosiers

### Journal

Publié le 1<sup>er</sup> février 2010 dans le Journal of Molecular and Cellular Cardiology (J Mol Cell Cardiol. 2010 Feb;48(2):310-21)

Reproduit avec la permission de Elsevier Limited

**Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy:  
Lessons from the dystrophic heart**

Yan Burelle<sup>a</sup>, Maya Khairallah<sup>b,c</sup>, Alexis Ascah<sup>a</sup>, Bruce G. Allen<sup>b,c,d</sup>, Christian F.  
Deschepper<sup>e</sup>, Basil J. Petrof<sup>f</sup>, Christine Des Rosiers<sup>b,c,\*</sup>

<sup>b</sup>Montreal Heart Institute, and the Departments of <sup>a</sup>Kinesiology, <sup>c</sup>Nutrition and Biochemistry, and <sup>d</sup>Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada.

<sup>e</sup>Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, Quebec H2W 1R7, Canada.

<sup>f</sup>Meakins-Christie Laboratories and Respiratory Division, McGill University, Montreal, Quebec H3A 1A1, Canada.

**Running Head:** Mitochondrial dysfunction prior to overt cardiomyopathy

\* Corresponding author.



## Abstract

While compelling evidence supports the central role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of heart failure, there is comparatively less information available on mitochondrial alterations that occur prior to failure. Building on our recent work with the dystrophin-deficient *mdx* mouse heart, this review focuses on how early changes in mitochondrial functional phenotype occur prior to overt cardiomyopathy and may be a determinant for the development of adverse cardiac remodelling leading to failure. These include alterations in energy substrate utilization and signalling of cell death through increased permeability of mitochondrial membranes, which may result from abnormal calcium handling, and production of reactive oxygen species. Furthermore, we will discuss evidence supporting the notion that these alterations in the dystrophin-deficient heart may represent an early “subclinical” signature of a defective nitric oxide/cGMP signalling pathway, as well as the potential benefit of mitochondria-targeted therapies. While the *mdx* mouse is an animal model of Duchenne muscular dystrophy (DMD), changes in the structural integrity of dystrophin, the mutated cytoskeletal protein responsible for DMD, have also recently been implicated as a common mechanism for contractile dysfunction in heart failure. In fact, altogether our findings support a critical role for dystrophin in maintaining optimal coupling between metabolism and contraction in the heart.

**Keywords:** Energy substrate metabolism; Cyclic GMP signalling; Duchenne muscular dystrophy; Mitochondrial transition pore; Cardioprotection.

*Abbreviations:* [ $^3\text{H}$ ]-DOG, [ $^3\text{H}$ ]-deoxyglucose;  $^{13}\text{C}$ , carbon 13; AMPK, AMP kinase; *anf*, atrial natriuretic factor; CAC, citric acid cycle; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; CHO, carbohydrates; CsA, cyclosporine-A; Cyp-D, cyclophilin D; DMD, Duchenne muscular dystrophy; FA, fatty acid; GC, guanylate cyclase; I-R, ischemia-reperfusion; LCFA, long chain fatty acid; LDH, lactate dehydrogenase;  $\text{mK}_{\text{ATP}}$ , mitochondrial  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels; mtDNA, mitochondrial DNA; NO, nitric oxide; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; PDE5, phosphodiesterase 5; PGC, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PTP, permeability transition pore; ROS, reactive oxygen species; SACs, stretch-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channels;  $\text{Scgd}^{-/-}$ ,  $\delta$ -sarcoglycan; *Sgca1*, soluble guanylate cyclase  $\alpha_1$ ; SOC, store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels

### **SPECIAL CHARACTERS**

$\gamma$

$\alpha$

$\sim$

$\beta$

$\delta$

## 1. Introduction

Mitochondria within cardiomyocytes are at considerable risk of undergoing adverse phenotypic changes during the acute and/or chronic physiologic stress events (e.g., ischemic or adrenergic challenge) associated with adverse cardiac remodelling. A reduced ability of mitochondria to withstand such stresses may constitute the primary event that places the heart into a vicious cycle of increasing dysfunction and cell death, ultimately resulting in heart failure. In fact, several studies in humans and animal models of adverse cardiac remodelling resulting from either genetic or acquired aetiologies demonstrate that in the failing heart, mitochondria display a number of ultra-structural, biochemical, and functional defects that are believed to contribute to energetic failure, oxidative stress, and activation of cell death (for recent reviews see: [1-6]). While these compelling data support the central involvement of mitochondria in the pathogenesis of heart failure, there is comparatively little information available on the mitochondrial alterations that occur during the period that precedes the transition to heart failure. In particular, measurements of the most commonly used markers of mitochondrial dysfunction have provided little evidence so far to suggest that mitochondrial dysfunction may contribute during the early compensated phases of cardiomyopathy to further deterioration of myocardial function. Accordingly, little changes have been observed during that period in either (i) activity of the mitochondrial respiratory chain complexes, (ii) respiratory performance in isolated mitochondria, (iii) activity, protein and/or mRNA levels of mitochondrial marker enzymes, master regulators of mitochondrial biogenesis (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator, PGC1 $\alpha$ ) or uncoupling proteins, (iv) acquired mutations or deletions of mtDNA, or (v) ultrastructural alterations. However, rather than dismissing a role for

mitochondria, this lack of evidence may simply reflect the necessity to use different kinds of end-point and experimental models to unravel mitochondrial abnormalities in the early phase of cardiomyopathies. Recent evidence emphasized the importance of using experimental approaches, which preserve the organization of mitochondrial supercomplexes [6,7]. Hence, the use of experimental approaches that capture the dynamics of the mitochondrial functional phenotype under various conditions, including the use of *ex vivo* experimental models such as the perfused heart, appear particularly relevant in this regard. In addition to the obvious advantage of preserving crucial metabolic and signalling cross-talk between cytosolic and mitochondrial compartments, which may themselves constitute compensatory mechanisms, the use of an intact heart preparation may also unmask abnormalities that are not readily observed *in vivo* due to the existence of compensatory mechanisms present within the intact organism.

The aforementioned concept is well illustrated by our recent studies in the dystrophin-deficient heart from the *mdx* mouse, the animal model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). Specifically, the use of a perfused, working heart model was instrumental in revealing, in this model, that early mitochondrial alterations in energy substrate metabolism do occur prior to the onset of overt cardiomyopathy [8,9]. Compared to other heart failure aetiologies such as myocardial infarction, atherosclerosis, hypertension and diabetes, much less is known about mitochondrial dysfunction in the dystrophic cardiomyopathy. This question is not only important for the identification of novel and much needed treatment avenues for DMD patients, but may also be of relevance for our understanding of the pathogenesis of heart failure in general. Indeed, changes in the integrity of dystrophin, a cytoskeletal protein, have recently been documented in patients with end-stage dilated, ischemic

and viral cardiomyopathies and, as thus, may represent a common pathway for contractile dysfunction in the failing heart [10-12].

Hence, building on our recent findings in the dystrophin-deficient heart, this review will focus upon how early mitochondrial alterations may represent a primary factor involved in the pathogenesis of the dystrophic cardiomyopathy, and thus, a potential target for therapeutic interventions. Specifically, we will begin with a brief overview of the clinical course of the dystrophic cardiomyopathy typically observed in humans and in the *mdx* mouse model, followed by a summary of our recently published findings on the metabolic alterations observed in the hearts of young *mdx* mice prior to overt cardiomyopathy. We will then present recent unpublished results that further substantiate the presence of early mitochondrial functional alterations in these hearts, specifically cell death signalling through enhanced permeability of mitochondrial membranes, which may result from an enhanced production of reactive oxygen species (ROS), as well as abnormal calcium handling or defective nitric oxide (NO)/cGMP signalling. In each section, we will briefly summarize the current literature supporting the existence of these specific mitochondrial functional alterations in other models of cardiomyopathies. Finally, we will discuss potential therapeutic strategies targeting these early mitochondrial alterations in the dystrophic heart.

## **2. Characteristics of the dystrophic cardiomyopathy in DMD**

DMD is an inherited X-linked disease resulting from mutations in the dystrophin gene located at Xp21, which leads to the absence of this cytoskeletal protein in striated (skeletal and cardiac) muscle cells. Dystrophin is part of a multimeric protein complex, the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) that links the cytoskeleton to the extracellular matrix and encompasses both mechanical and

signaling roles. Defects in the gene encoding other protein members of this complex, namely the sarcoglycans, sarcospan, dystroglycans, dystrobrevins and syntrophins, also lead to muscular dystrophy (MD), although the age of onset, affected muscles, and severity may vary considerably (For a recent review see ref. [13]). Cardiac involvement has been reported for some but not all of these proteins, namely dystrophin (DMD),  $\delta$ -sarcoglycan (Limb girdle MD),  $\beta$ -sarcoglycan and dystrobrevins (for reviews, see refs [14,15])

This review article will mainly focus on DMD, which is the most common form of MD. Although the first clinical manifestations of DMD are generally related to skeletal muscle weakness, cardiac involvement is inescapable with age and can progress to heart failure. Typically, the development of dilated cardiomyopathy occurs progressively over time such that by 18 years of age, 98% of DMD patients display echocardiographic evidence of contractile dysfunction and electrocardiographic abnormalities such as arrhythmias [16,17]. Experimental and clinical evidence also suggests that this cardiac involvement can occur in the absence of clinically apparent skeletal muscle involvement or pathological defects in the vasculature [18-20]. Ultimately progression toward heart failure, characterized by pronounced ventricular fibrosis, will occur in 40% of patients between 10 and 30 years of age [16,17,21,22].

This time course of disease progression is in many ways recapitulated in the *mdx* mouse, the most widely used animal model of DMD. Indeed, hearts from *mdx* mice do not display apparent signs of cardiomyopathy prior to 25-30 weeks of age [23]. Selective fibrosis of the left ventricle, cardiac dilation, and more marked deterioration of function usually become evident by 40 weeks of age and worsens over time [23-25].

Currently, the mechanism responsible for the development of dilated cardiomyopathy in DMD is unclear. In skeletal muscle, the primary organ responsible for the debilitating effect of the disease, myofibers lacking dystrophin are abnormally susceptible to load-induced sarcolemmal damage [26]. Similar to skeletal muscles, our group and others showed that increasing cardiac workload either by (i) physical exercise, (ii) acute *in vivo* administration of a  $\beta$ -adrenergic agonist, (iii) *ex vivo* heart perfusion in the working mode, or (iv) aortic constriction, leads to elevated sarcolemmal injury in dystrophin-deficient mice compared to control mice and in some conditions, high mortality rates [9,27-29]. While mechanical instability and ensuing rupture of the sarcolemmal membrane are likely a cause of cardiomyocyte death, based on the current literature in skeletal muscle [26,30,31], the lack of functional dystrophin in cardiomyocytes may also have other consequences that could play important roles in disease progression, including increased oxidative stress, alterations in cellular  $\text{Ca}^{2+}$  handling, and pronounced reductions in NO signaling due to an impaired activity of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) [13]. In skeletal muscle, the absence of dystrophin results in displacement of nNOS from plasma membrane, where it normally binds directly to syntrophins (which are cytoplasmic proteins anchored to dystrophin's carboxyterminal domain), to cytoplasm. Although this relocalization has not been demonstrated in the heart, Bia et al. [24] demonstrated that the lack of dystrophin in the *mdx* mouse resulted in abnormal electrocardiograms that are associated with decreased myocardial nNOS activity. Furthermore, recent studies emphasized the importance of nNOS subcellular (re)localization and interactions with other proteins as a factor regulating myocardial contractility in normal and failing heart [32-34]. However, much remains to be learned about the role and regulation of this nNOS derived NO signalling. Irrespective of the exact molecular mechanisms involved, abnormalities in NOS

signalling,  $\text{Ca}^{+2}$  handling and oxidative stress, all have the potential to induce or may be the result of changes in mitochondrial function, as will be detailed below.

### **3. The dystrophic mouse heart displays early abnormalities of mitochondrial metabolic function**

#### *3.1. Alterations in mitochondrial substrate metabolism in other models of cardiac hypertrophy and failure*

The importance of mitochondrial substrate metabolism in cardiac hypertrophy and failure has been the subject of numerous recent reviews [35-39] and consequently this topic will only be briefly summarized to highlight certain issues. In brief, alterations in cardiac energy substrate metabolism are currently considered as an independent determining factor that contributes to contractile dysfunction as well as disease progression from left ventricular hypertrophy to heart failure. However, there is an ongoing debate as to why cardiac remodelling, particularly in the early compensatory phase prior to clinical manifestations, results in a shift in substrate selection for energy production from long chain fatty acids (LCFA, which supplies normally ~70% of the heart's energy demand through mitochondria  $\beta$ -oxidation) to carbohydrates (CHO). Such changes are believed to represent a recapitulation of the fetal program, and while this has been shown to be a characteristic of several models of cardiomyopathy, it has not been a consistent finding [38,40,41]. The precise causes as well as the consequences of this substrate shift are also unclear, i.e., is it harmful or beneficial for cardiac function? What are the consequences of this shift on the development and progression of cardiac hypertrophy and failure? On one hand, there is evidence that this shift in substrate use from LCFA to CHO may be



beneficial for the post-ischemic and failing heart. The potential benefits could include: (i) the greater ATP-to-oxygen ratio associated with glucose utilization (11% to 12%), (ii) a more efficient matching between cytosolic glycolysis and mitochondrial oxidation, thereby decreasing the production of protons which can promote detrimental calcium overload, and (iii) improved ion pump function linked to glycolytic flux). On the other hand, potential detrimental consequences of chronic inhibition of mitochondrial LCFA oxidation include intracellular lipid accumulation and its associated lipotoxic sequelae as well as energy starvation, principally under conditions of increased energy demand [36,38,42-47].

Recent studies with genetically-modified mouse models of cardioprotection (for e.g. calcineurin-knockout mouse [48]; the glycogen synthase kinase-3 overexpressing mouse [49]; cardiomyocyte-specific constitutively active guanylate cyclase ( $GC^{+/0}$ ) overexpressing mouse [50], appear, however, to provide some insights in this debate. In fact, we found that working  $GC^{+/0}$  mouse hearts display a metabolic profile that is partly reminiscent of that reported in compensated hypertrophied hearts (namely decreased LCFA  $\beta$ -oxidation, no change in CHO oxidation and increased glycolysis [51-53]. A similar profile was also reported in the other mouse models of cardioprotection, suggesting that it is beneficial. However,  $GC^{+/0}$  mouse hearts exhibited also two striking and distinctive features: (i) the glycolytically-derived lactate and pyruvate production ratio (reflecting the cytosolic redox state of the cells) was conserved and (ii) triglyceride synthesis was enhanced concomitantly with lipolysis. In fact, in this model of cardioprotection, the increased triglyceride synthesis/hydrolysis turnover seems to explain the observed decrease in LCFA  $\beta$ -oxidation, which was documented by tracking the fate of exogenously administered and labeled LCFA, a commonly used experimental paradigm. The importance of lipolysis for normal cardiac homeostasis was also recently emphasized

by studies with transgenic mice lacking enzymes involved in this process (for e.g. adipose triglyceride lipase, lipoprotein lipase) [54-55]. However, much remains to be learned about the consequences of alterations in myocardial substrate metabolism – beyond their selection for energy production – on the development of cardiac hypertrophy and failure.

### *3.2. Alterations in mitochondrial substrate metabolism in the early pre-clinical stages of the dystrophic cardiomyopathy*

Using dystrophic (*mdx*) mice at the young age of 10-12 weeks (where histological or echocardiographic evidence of cardiac disease cannot be detected yet), we measured the metabolic and functional responses of their hearts, using *ex vivo* whole organ perfusion in the working mode with carbon 13 ( $^{13}\text{C}$ )-labeled substrates [56]. Results that were obtained in these experiments are summarized in Table 1. Briefly, at a physiological afterload (50 mmHg) and with buffer substrate concentrations designed to mimic the *in vivo* milieu, *mdx* hearts demonstrated: (i) compromised cardiac contractile function and efficiency, and (ii) reduced cellular integrity as reflected by a greater lactate dehydrogenase release [8]. It is noteworthy, however, that the performance of *mdx* hearts in the above study, which were perfused with multiple substrates consisting of CHOs (glucose, lactate, pyruvate) and a LCFA (oleate), was by far superior to that previously reported with glucose as the sole substrate [27], pointing to a need for an increased and balanced substrate supply in order to achieve adequate ATP production in the *mdx* heart.

In addition, at the metabolic level, we found that *mdx* mouse hearts displayed: (i) a marked shift from LCFA to CHO oxidation for energy production associated with enhanced oxygen consumption, (ii) a reduction in citric acid cycle (CAC)

intermediates tissue levels, and (iii) a 20% lower activity of the CAC enzyme aconitase. The metabolic shift from LCFA to CHO that we observed in young *mdx* mice concurs with findings from cardiac positron emission tomography studies performed in patients with DMD using  $^{18}\text{F}$ -deoxyglucose or a radioiodinated branched fatty acid ( $[^{123}\text{I}]$  15-(p-iodophenyl)-3-(R,S)-methylpentadecanoic acid (BMIPP)) [57-60]. Although metabolic flux parameters relative to LCFA partitioning between oxidation and triglyceride synthesis were not specifically assessed in our study, our results indicated that the contribution of endogenous substrates (postulated to be triglycerides) to acetyl-CoA production was similar to controls at this early stage of the cardiomyopathic process, presumably because lower LCFA oxidation was compensated by increased CHO oxidation. Taken together, these results strongly suggest the existence of early mitochondrial metabolic alterations in the young dystrophic *mdx* mouse heart at a time that clearly precedes the onset of overt cardiomyopathy [8]. To the best of our knowledge, cardiac energy substrate metabolism has not been assessed in any of the other MD mouse models.

### *3.3. Putative mechanisms responsible for the mitochondrial metabolic alterations in the dystrophic heart*

Numerous candidate mechanisms were considered to explain the documented substrate shift in dystrophic hearts. We initially examined two interacting nutrient signaling pathways, Akt and AMPK, given their roles in regulating glucose uptake and utilization [61,62]. Compared to controls, *mdx* mouse hearts showed a significantly lower Akt phosphorylation state and no differences in AMPK phosphorylation or activity, the latter being consistent with the lack of significant differences in the AMP-to-ATP ratio between the two groups of isolated hearts.

However, neither the Akt nor the AMPK results could directly account for the observed substrate shift towards CHO. However, another signaling pathway that could help explain the metabolic shift observed in the perfused *mdx* heart is the p38 MAPK pathway, which has been shown to be involved in regulating substrate energy metabolism [63] through the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\alpha$ ), a transcriptional regulator of FA oxidation enzyme expression. Phosphorylation of PPAR $\alpha$  by p38 may lead to an increase in ligand-dependent transactivating functions and enhanced functional cooperation with PGC-1 $\alpha$ . We have found a significant 2-fold decrease in p38 phosphorylation (unpublished data), which may account, at least in part, for the observed decrease in LCFA oxidation in the dystrophic heart.

To further explore the possible relationship between our observations and evolution of the dystrophic cardiomyopathy in *mdx* mice, we undertook a quantitative comparison of young (10-12 weeks) versus older (25 weeks) dystrophic hearts with respect to PPAR $\alpha$ -regulated genes involved in FA  $\beta$ -oxidation. In young *mdx* mice, where there are little obvious signs of cardiomyopathy, there were no changes in gene expression that could account for the concurrent shift in substrate utilization. However, in 25 week-old *mdx* mice, the developing cardiomyopathy was accompanied by slight changes in the gene expression levels of PPAR $\alpha$ , pyruvate dehydrogenase kinase-4 and myosin heavy chain  $\beta$ , which might be compatible with a trend to recapitulate the fetal gene expression phenotype. Furthermore, this is associated with a significant rise in *anf* gene expression and a significant increase in transcript levels of *Sgca*<sub>1</sub>. The latter is a well-known target gene of the NO/cGMP pathway, which has been shown to negatively correlate with cGMP levels [64]. In addition, although *anf* expression is often used as a marker of cardiac remodeling, recent studies have also emphasized new cardioprotective roles for natriuretic

peptides, particularly under conditions of defective NO signaling (for review see: [65]).

In this regard, existing literature did support the presence of defective NO signaling within *mdx* hearts [24,66,67] as well as a crucial role for this pathway in optimizing metabolism-contraction coupling [68,69]. In our denervated *mdx* heart perfusion model, in which the buffer is not recirculated preventing compounds released by the heart from accumulating, the natriuretic peptide signaling pathway is unlikely to be optimally active despite a potential autocrine action of natriuretic peptides. This provided a potential explanation for the fact that metabolic changes observed in *mdx* hearts were most evident when these hearts were perfused *ex vivo* [8]. In addition, the pattern of metabolic alterations in the perfused *mdx* hearts, namely the observed metabolic shift in substrate utilization from LCFA to CHO oxidation and the enhanced MVO<sub>2</sub>, is consistent with decreased NO signalling [69]. Finally, a defect in NO/cGMP signaling is also compatible with decreased levels of phosphorylated Akt, an activator of endothelial NO synthase, in *ex vivo* perfused *mdx* hearts [61].

#### *3.4. Establishing a role for the NO/cGMP pathway in mitochondrial metabolic alterations of the dystrophic heart*

To more firmly establish a link between defective NO/cGMP signaling and mitochondrial function abnormalities, we recently increased cGMP signaling downstream of NO formation in *mdx* mice by using either 1) a targeted genetic approach, where *mdx* mice were crossed to transgenic mice overexpressing guanylyl cyclase in a cardiomyocyte-specific manner, or 2) a pharmacological approach, where cGMP breakdown was inhibited by chronically treating young (6 week-old)

*mdx* mice with the PDE5 inhibitor sildenafil. We found that increasing cGMP signaling significantly improved mitochondrial metabolic and function status of *mdx* mouse hearts, along with cardiac contractility and sarcolemmal integrity [9].

Specifically, at the metabolic level, 12-week-old *mdx*/GC<sup>+/-</sup> hearts displayed a pattern of substrate selection for energy production that was similar to that of their *mdx* counterparts. This finding raises the following question: what are the potential cause(s) or consequence(s) of the previously documented shift from LCFA to CHO utilization in 12-week-old *mdx* hearts compared to controls? At least two explanations for this observation can be put forward. First, this shift may be a direct or indirect consequence of dystrophin deficiency. Indeed, cytoskeletal disturbances subsequent to dystrophin-deficiency may impact on the compartmentalization of cytosolic carbohydrate metabolism [70,71]. Furthermore, dystrophin deficiency also results in abnormalities in calcium handling, a factor that may also independently impact substrate metabolism [72].

Another possibility is that the metabolic shift previously reported in *mdx* hearts may represent an adaptive response rather than a deleterious consequence of cardiac dysfunction. In fact, our finding of a substrate shift from LCFA to CHO utilization associated with enhanced glycolysis is in agreement with our findings in the cardioprotected GC<sup>+/-</sup> mouse hearts, as discussed earlier [50]. However, it appears warranted to further investigate (i) how the *mdx* heart handles lipids, including the partitioning of exogenous fatty acids between oxidation (for energy production) and triglycerides (for storage) as well as triglyceride hydrolysis particularly as the cardiomyopathy progresses, and (ii) how this would be affected by enhancing cGMP signaling.

Beyond considerations about substrate selection, our finding of a marked increase in the mitochondrial CAC pool size in the perfused *mdx*/GC<sup>+/-</sup> heart

compared to their *mdx* counterparts, suggested an improved mitochondrial metabolic status in the former group. Such a change would be expected to enable the *mdx* heart to enhance CAC flux, and hence mitochondrial NADH and energy production, especially under conditions of high energy demand. It is noteworthy that a downregulation of mitochondrial gene expression has been reported in dystrophic skeletal muscle [73]. Conversely, the induction of PGC-1 $\alpha$ , a factor governing mitochondrial biogenesis [5,74], was found to improve indices of skeletal muscle damage in *mdx* mice [75]. However, we did not observe a difference in mitochondrial citrate synthase activity (a marker of mitochondrial volume-density) in young 12-week-old *mdx* mouse hearts [8], although it was found to be decreased by 18% at 8 months [76]. These results suggest that, at least at a young age, factors other than PGC-1 $\alpha$  levels modulate the mitochondrial metabolic status of the *mdx* mouse heart. This improved mitochondrial metabolic status in *mdx*/GC<sup>+/o</sup> mouse hearts reconciles many findings in the literature that support the role of cGMP signalling in preventing mitochondria-mediated cell death which will be further discussed in Section 4.3.

Overall, our findings in *mdx*/GC<sup>+/o</sup> and GC<sup>+/o</sup> mice suggest that the metabolic shift from LCFA to CHO in *mdx* heart may be an adaptive response. While additional studies are needed to clarify how the enhancement of NO/cGMP signaling in the *mdx* heart might impact on CHO and LCFA utilization, based on the marked improvement in mitochondrial CAC intermediate levels in perfused *mdx*/GC<sup>+/o</sup> hearts, the mitigation of the dystrophic cardiomyopathy found in these mice may be mediated, at least in part, by an improved mitochondrial function resulting from enhanced cGMP signalling.

#### **4. Is the dystrophic heart more vulnerable to induction of mitochondrial cell death pathways?**

##### **4.1. Mitochondrial cell death pathways in other models of cardiac hypertrophy and failure**

In addition to energy production, mitochondria play several important roles in other cellular functions: (i) regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics by taking up and releasing large amounts of  $\text{Ca}^{2+}$  [77-80], (ii) ROS production, that can trigger signalling pathways or induce cell injury [81-84], and (iii) regulation of cell death through their ability to trigger necrosis and apoptosis [85-88] by changing mitochondrial membrane permeability [88-90].

Studies employing models of acquired cardiomyopathy have shown that, in addition to overt structural [91,92] and respiratory defects [93-101], mitochondria within the failing myocardium display enhanced ROS production [94,95,102,103]. This is associated with signs of oxidative stress-related damage such as accumulation of lipid peroxidation by-products and mutations or deletions of mtDNA [94,104,105]. In addition, experimental evidence obtained both in humans and animal models indicates that failing hearts display enhanced permeability of mitochondrial outer [106-108] and inner [97,109] membranes, leading to release of mitochondrial pro-apoptotic factors such as cytochrome c [110,111] and activation of other downstream events, including cleavage of pro-caspase 3 [106,110] and 9 [111]. Hence, these results indicate that the mitochondrial death pathway is active in the failing heart and likely plays a role in the associated cardiomyocyte death.

Although the molecular events involved in mitochondrial membrane permeation are not well understood, the current consensus is that several mechanisms co-exist and may be recruited in response to specific death stimuli [88,112]. One major



mechanism involves the oligomerization of pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family to form pores across the outer mitochondrial membrane [88,112]. Another important and well characterized mechanism involves the opening of the PTP, a high conductance non-specific channel in the mitochondrial inner membrane [88,90].

Recently published work from our group supports the notion that increased susceptibility of mitochondria to opening of the permeability transition pore (PTP) during periods of stress could be an important early factor in the progression towards heart failure by promoting cell death [113,114]. Specifically, we have assessed myocardial PTP opening in the intact rat heart as well as in isolated mitochondria during the early stages of ventricular remodelling, prior to the onset of systolic dysfunction or overt mitochondrial structural and respiratory defects. Mitochondria isolated from hypertrophied rat hearts displayed an increased susceptibility to opening of the PTP in response to a physiological stressor *in vitro* (i.e.,  $\text{Ca}^{2+}$  overload, anoxia-reoxygenation). This was also observed in the intact perfused heart following ischemia-reperfusion (I-R) [113], and was associated with an impaired functional recovery, greater tissue release of lactate dehydrogenase (LDH), and mitochondrial release of pro-apoptotic factors upon reperfusion. Other studies have shown that hypertrophied hearts are more susceptible to contractile dysfunction and cell death when exposed to stimuli such as  $\text{H}_2\text{O}_2$  [1115] and ischemia-reperfusion (I-R) [116-118], which are known to promote PTP opening. Importantly, in at least one of these studies [115], susceptibility to stress-induced cell death could be detected in cardiomyocytes isolated from hypertrophied hearts prior to detection of apoptotic cell death in the whole organ *in situ*. The latter became substantial only once the heart had reached the failing stage, further suggesting that mitochondrial vulnerability to stress is a precursor event in the progression toward organ failure.

#### 4.2. Activation of mitochondrial death pathways in the dystrophic heart

Considering our findings of increased CAC intermediate levels in perfused *mdx*/GC<sup>+/-</sup> hearts compared to their *mdx* counterparts [9], and of an increased susceptibility to PTP opening in the early stages of cardiomyopathy in our rat studies [113,114], we recently determined whether vulnerability to PTP opening could be involved in the enhanced cardiomyocyte injury previously observed in the hearts of young *mdx* mice challenged by physiological stressors [8,9,27]. To accomplish this, we adapted the mitochondrial [<sup>3</sup>H]-deoxyglucose ([<sup>3</sup>H]-DOG) entrapment method used to quantify PTP opening in rat hearts [97,113,119,120] to the mouse. Using this approach, we found that when hearts of young *mdx* mice are subjected to I-R, the number of mitochondria undergoing PTP opening is significantly enhanced compared to normal hearts (Fig 1). Enhanced PTP opening is accompanied by greater release of cytochrome c (Cyt-c) into the cytosolic fraction (Fig 1E), which further supports enhanced mitochondrial membrane permeability. As opening of the PTP allows for ions and solutes of <1500 Da to equilibrate across mitochondrial membranes, we postulate that this phenomenon could account, at least in part, for the reduction in citrate and total CAC pool size that we previously observed in *ex vivo* perfused working hearts from *mdx* mice [8,9]. Furthermore, because this susceptibility to PTP opening is present prior to any histological or hemodynamic evidence of cardiomyopathy, we believe that it may play an important pathogenic role in the ensuing development of the dystrophic cardiomyopathy. In support of this interpretation, Millay *et al.* [121] recently reported that genetic ablation of the PTP-sensitizing protein cyclophilin-D (Cyp-D) in  $\delta$ -sarcoglycan (*Scgd*<sup>-/-</sup>) null mice, another model of muscular dystrophy in which there is associated sarcolemmal instability, resulted in significantly reduced cardiac fibrosis and improved ejection fraction. Recent data obtained in skeletal muscle from other forms of MD, including

Bethlem myopathy, Ullrich congenital dystrophy, and Limb-girdle MD [121-124] also support a role for PTP opening, but whether this applies also to the heart has not yet been established.

#### 4.3. Potential factors underlying greater vulnerability to PTP opening in the dystrophic heart

There are several factors that could potentially account for the enhanced propensity of the dystrophin-deficient heart to PTP opening. These include: mitochondrial calcium accumulation, enhanced oxidative stress, and altered cGMP signalling, which could act alone or in synergy. Acute ischemic episodes, similar to what has been described for skeletal muscles, could also contribute to this phenomenon, though this remains to be substantiated in the dystrophin-deficient heart [125-126]. Firstly, accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  in the mitochondrial matrix is recognized as one of the most important triggers for permeability transition [127] and the lack of dystrophin (or  $\delta$ -sarcoglycan) predisposes to disruption of the sarcolemmal membrane during mechanical stress, resulting in increased  $\text{Ca}^{2+}$  entry. In addition, it is now well recognized that there are other important sources of increased  $\text{Ca}^{2+}$  levels within dystrophic muscle cells, even in the absence of sarcolemmal disruption. These include an increased  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage-independent stretch-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -leak channels (SACs) [128,129] and store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (SOCs) [130-132], as well as potentially via the ryanodine receptor [133]. Several studies in cardiac [134,135] and skeletal muscle cells [132,136] indicate that because of their localization in the vicinity of the sarcoplasmic reticulum and T-tubules, mitochondria rapidly take up  $\text{Ca}^{2+}$  entering the cytosol during depolarization. Thus mitochondria from dystrophic myocytes are

likely to be more susceptible to  $\text{Ca}^{2+}$  overload due to increased  $\text{Ca}^{2+}$  influx from several sources [131-132].

Enhanced production of ROS is another major factor, which may act synergistically with  $\text{Ca}^{2+}$  overload to induce PTP opening [127]. The activities of aconitase and NADP-isocitrate dehydrogenase, two mitochondrial enzymes that are notoriously sensitive to inactivation by ROS, are reduced in adult skeletal muscle from *mdx* mice compared to control [137]. Importantly, the muscle glutathione pool was significantly more oxidized in 14-day-old *mdx* mice (*i.e.* prior to the onset of skeletal muscle fiber necrosis, which occurs at ~4 weeks of age) compared to normal mice, consistent with the notion that, in dystrophic muscle, chronic oxidative stress constitutes a primary defect rather than being solely a consequence of necrosis [137]. Although little data is available on mitochondrial oxidative stress in the dystrophic heart, we found that aconitase activity was reduced (25 %) in *mdx* hearts compared to controls at 12 weeks of age (*i.e.* prior to any overt sign of cardiomyopathy) [8] (Fig. 2). However, respiratory function measured in isolated mitochondria from young *mdx* hearts was similar to controls (Fig. 2, unpublished observations), as also previously described by Kuznetsov *et al.* [138], suggesting that there are no major defects in respiratory chain complexes at this early stage. While these results clearly indicate that factors which promote oxidative stress are present in mitochondria from dystrophic hearts, it is still unclear whether this is caused by enhanced  $\text{H}_2\text{O}_2$  production or by a reduction in the capacity of one or more of the mitochondrial  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenging systems such as the glutathione and thioredoxin systems, catalase, or other non-enzymatic reactions.

Finally, our finding [9] that expression of the  $\text{GC}^{+/o}$  transgene in *mdx* cardiomyocytes largely prevented the loss of CAC intermediates in hearts perfused

*ex vivo* in the working mode suggests that defective NO/cGMP signalling may contribute to the enhanced propensity of the dystrophic heart to opening of the PTP. Although unequivocal proof requires a comparative assessment of PTP opening in *mdx* and *mdx/GC<sup>+/-</sup>* hearts, there is published evidence in support of a link between cGMP signalling and mitochondrial PTP opening, including results from studies that examined the impact of enhancing cGMP signalling by either inhibiting its breakdown with the phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil, or increasing its formation by stimulating the natriuretic receptors in the setting of ischemia-reperfusion or doxorubicin-induced cardiotoxicity [139-141]. The underlying mechanisms appear to involve the capacity of cGMP-dependent protein kinase (PKG) to inhibit the PTP through opening of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels (mK<sub>ATP</sub>) [140-143]. Recent studies by Kukreja and coll. provide compelling evidence that ERK1/2 may be a key mediator that bridges PKG to mK<sub>ATP</sub> [144]. In addition, cGMP-dependent signalling has the potential to reduce PTP opening indirectly through its impact on intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics. In fact, data obtained in various cell types including cardiomyocytes show that PKG can potentially reduce intracellular calcium levels by inhibiting: (i) the synthesis of inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>), (ii) the release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores through the IP<sub>3</sub> receptor, (iii) SERCA2a-mediated Ca<sup>2+</sup> reuptake, and (iv) the influx of extracellular Ca<sup>2+</sup> through L-type Ca<sup>2+</sup> channels [145,146].

Taken together, these results suggest that, similar to what has been observed in volume overload-induced cardiac hypertrophy [113,114], mitochondria within dystrophin-deficient cardiomyocytes are more prone to PTP opening than are those from normal cardiomyocytes when challenged with a stressor. More importantly, this phenomenon is present at the early stages of disease progression and contributes directly to the development of histological and hemodynamic evidence of

cardiomyopathy [121]. Although all of the mechanisms underlying these phenomena remain to be clarified, increased  $\text{Ca}^{2+}$  entry, enhanced oxidative stress within mitochondria, and impaired NO/cGMP signalling are likely to play key roles.

## **5. Mitochondrial protection: a potential strategy to protect the dystrophic heart**

While the dystrophic cardiomyopathy can be symptomatically treated directly with conventional heart failure therapy such as  $\beta$ -adrenergic blockers or angiotensin-converting enzyme inhibitors, novel therapies are being sought to specifically correct functional defects resulting from dystrophin deficiency [147-151]. In this regard, current strategies that are being developed include stem cell approaches as well as gene transfer of dystrophin, utrophin, or functional dystrophin fragments (microdystrophins). However, the effectiveness of these interventions remains to be established, particularly with respect to cardiac muscle function given that for the most part, these interventions have been tested predominantly on dystrophic skeletal muscle. In the meantime, alternative adjunct therapies are being sought to slow disease progression, and these could ameliorate both the cardiac and skeletal muscle dysfunction [152]. In view of the evidence presented in this review, pharmacological strategies aimed at preventing mitochondrial dysfunction, particularly with respect to reducing oxidative stress and opening of the PTP, appear to be a promising avenue. In this regard, three strategies will be discussed briefly: the use of cyclophilin-D ligands, mitochondria-targeted antioxidants, and phosphodiesterase 5 inhibitors.

### 5.1. Cyclophilin-D ligands

Cyclophilin D (Cyp-D) is a chaperone-like protein of the immunophilin family located in the mitochondrial matrix, which acts as a potent PTP sensitizer when translocated to the inner membrane and bound to putative pore components [153-155]. In fact, cyclosporin-A (CsA), an inhibitor of PTP opening, has long been known to act *in vitro* by binding Cyp-D, thus preventing its recruitment to the mitochondrial inner membrane [155,156]. Until recently, however, the potential benefits of chronic treatment with CsA were limited by its capacity to also inhibit calcineurin complexed to cyclophilin-A, causing a number of deleterious effects in myocytes, including enhancement of apoptosis [157-159]. Fortunately, several CsA analogs that do not inhibit calcineurin have now been developed, including NIM811, Sanglifehrin-A, and Debio025. To date, the therapeutic potential of Cyp-D ligands in the treatment of DMD has only been evaluated in skeletal muscle [121,124]. Specifically, administration of Debio025 for six weeks in young *mdx* mice significantly reduced fibrosis and the percentage of fibers containing central nuclei in the diaphragm, EDL, TA, and quadriceps muscles [1121]. Based on our recent results (Fig. 1), as well as the recently reported improvement of cardiac outcomes following genetic ablation of Cyp-D in the  $\delta$ -sarcoglycan deficient mouse [121], one would anticipate that Cyp-D ligands could also be effective in slowing progression of the cardiomyopathy in DMD patients.

### 5.2. Mitochondria-targeted antioxidants

Given the evidence that oxidative stress within mitochondria is increased at very early stages of disease progression in *mdx* mice [8,137] (Fig. 2), antioxidant therapies appear to be another logical approach for the treatment of DMD. In fact, buffering

excessive ROS production within mitochondria could be beneficial not only by limiting oxidative damage to mitochondrial and cellular structures, but also by reducing the likelihood of PTP opening [127]. Various antioxidants, such as vitamin E and selenium [160], were considered but not found to be beneficial against the progression of DMD. However, given the complexity of free radical biology, the design of antioxidant therapies remains difficult [161]. Nevertheless, Buyse *et al.* [162] recently reported the benefits of the antioxidant idebenone (SNT-MC17) in a long-term placebo-controlled study in the dystrophin-deficient *mdx* mouse. Specifically, this treatment was found to (i) improve diastolic dysfunction, (ii) limit mortality from cardiac pump failure induced by dobutamine stress testing *in vivo*, (iii) reduce cardiac inflammation and fibrosis, and (iv) enhance exercise performance.

In recent years, a novel class of antioxidants that specifically accumulate within mitochondria in large amounts has emerged. The development of these agents was motivated by the recognition that the lack of effectiveness of classical antioxidant therapies in some pathologies in which mitochondrial oxidative stress is known to develop, could be caused by the inability to mobilize sufficient amounts of antioxidants within these organelles. Among the agents available, Mito-Q, developed by Murphy *et al.*, has reached clinical trials [163,164]. The superiority of these mitochondria-targeted antioxidants over untargeted coenzyme Q derivatives, such as idebenone, has been demonstrated in Friedreich Ataxia fibroblasts [164], but has not yet been tested in the dystrophin-deficient heart.

### 5.3. NO/cGMP signalling

Enhancing cGMP signalling, specifically downstream and independent of NO formation, improved contractile performance, mitochondrial metabolic alterations,



and sarcolemmal integrity in the young *mdx* mouse heart [9]. More recently, Paschen *et al.* reported that 3-month sildenafil treatment in *mdx* mice started at 12 months of age was able to reverse the existing cardiac dysfunction [165]. These findings point to defective cGMP signalling as being an important component of disease pathogenesis in the dystrophin-deficient heart, and also suggest the basis for a novel therapeutic approach to prevent or delay the onset of dystrophin-related cardiomyopathies. Since there are currently safe and well-tolerated pharmacological means to enhance cGMP signalling, such drugs could provide the basis for a new therapeutic strategy based upon PDE5 inhibition in the dystrophic heart. This type of intervention may be considered as an adjunct therapy to other available treatments [151]. Asai *et al.* [166] also showed that treatment with tadalafil, another PDE5 inhibitor, ameliorates contraction-induced skeletal muscle damage. While the mechanisms underlying the beneficial effects of enhanced cGMP signalling in the dystrophic heart remain to be established, our studies suggest that preservation of mitochondrial function could play an important role [9]. This “mito-protective” effect could be partly related to a better maintenance of anaplerotic fluxes responsible for the maintenance of CAC pool size and/or to an improved mitochondrial integrity due to inhibition of PTP opening. This latter possibility would be consistent with the existing literature showing that inhibition of mitochondrial PTP opening through activation of  $K_{ATP}$  channels is an end effector of pre-conditioning induced by cGMP-dependent signaling [140-143]. Interestingly, dystrophin has also been recently proposed to be an end-target of ischemic pre-conditioning [167].

## 6. Conclusion

Based on the evidence discussed in this review, we propose a simplified integrated mechanistic scheme of potential players and consequences of early mitochondrial dysfunction in the dystrophin-deficient heart (Fig. 3). Taken together, recent results highlight early mitochondrial functional alterations in the dystrophic heart that precede overt cardiomyopathy. These mitochondrial alterations include: (i) CAC-related metabolic parameters such as decreased aconitase activity and lower levels of CAC intermediate levels, which are factors that may limit the capacity of the dystrophin-deficient to withstand an increase in energy demand as occurs during an adrenergic challenge, and (ii) an enhanced propensity of the dystrophin-deficient heart to PTP opening. While we also demonstrated that *ex vivo* perfused working hearts from young *mdx* mice display early alterations in energy substrate selection for energy production, namely a shift from LCFA to CHO oxidation, further investigations are needed to better understand the causes and potential consequences of this metabolic alteration. Overall, defective NO/cGMP signalling appears to be a likely candidate mechanism contributing to these mitochondrial alterations, particularly the enhanced opening of the PTP, which in itself may be a factor governing mitochondrial efflux of CAC intermediates. Additional factors that may contribute to mitochondrial dysfunction in the dystrophin-deficient heart include augmented ROS production and abnormal calcium handling. Therefore, it appears warranted to consider therapeutic interventions which specifically target these mitochondrial abnormalities, including phosphodiesterase inhibitors (e.g., sildenafil), along with newly emerging agents. Given dystrophin's implication in other end-stage cardiomyopathies and the central role of mitochondria in heart failure, the aforementioned mitochondria-targeted therapeutic approaches appear to offer

promising avenues for patient management that extend beyond the dystrophic cardiomyopathy.

### Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grants 9575 to C.D.R. 77791 to B.G.A.) and a Pfizer Cardiovascular Award (to Y.B.). Y.B. is a Junior II Research Scholar and B.J.P. is a National Research Scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). The authors gratefully acknowledge the secretarial assistance of Antoinette Paolitto.

### References

- [1] Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest.* 2005; 115(3): 547-55.
- [2] Marin-Garcia J, Goldenthal MJ. Mitochondrial centrality in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2008; 13(2): 137-50.
- [3] Murray AJ, Edwards LM, Clarke K. Mitochondria and heart failure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007; 10(6): 704-11.
- [4] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009; 81(3): 449-56.
- [5] Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res.* 2008; 79(2): 208-17.
- [6] Lemieux H, Hoppel CL. Mitochondria in the human heart. *J Bioenerg Biomembr.* 2009 Apr 8.
- [7] Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, et al. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 2008; 80(1): 30-9.
- [8] Khairallah M, Khairallah R, Young ME, Dyck JR, Petrof BJ, Des Rosiers C. Metabolic and signaling alterations in dystrophin-deficient hearts precede overt cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 43(2): 119-29.
- [9] Khairallah M, Khairallah RJ, Young ME, Allen BG, Gillis MA, Danialou G, et al. Sildenafil and cardiomyocyte-specific cGMP signaling prevent cardiomyopathic changes associated with dystrophin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(19): 7028-33.
- [10] Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, et al. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med.* 1999; 5(3): 320-6.
- [11] Rodriguez M, Cai WJ, Kostin S, Lucchesi BR, Schaper J. Ischemia depletes dystrophin and inhibits protein synthesis in the canine heart: mechanisms of myocardial ischemic injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 38(5): 723-33.
- [12] Vatta M, Stetson SJ, Perez-Verdia A, Entman ML, Noon GP, Torre-Amione G, et al. Molecular remodelling of dystrophin in patients with end-stage

- cardiomyopathies and reversal in patients on assistance-device therapy. *Lancet*. 2002; 359(9310): 936-41.
- [13] Wallace GQ, and McNally EM, Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies, *Annu. Rev. Physiol.* 2009; 7: 37–57.
  - [14] Towbin JA, and Bowles NE, The failing heart, *Nature* 2002; 415: 227–233.
  - [15] Goodwin FC, and Muntoni F, Cardiac involvement in muscular dystrophies: molecular mechanisms, *Muscle Nerve* 2005; 32: 577–588.
  - [16] Nigro G, Comi LI, Limongelli FM, Giugliano MA, Politano L, Petretta V, et al. Prospective study of X-linked progressive muscular dystrophy in Campania. *Muscle Nerve*. 1983; 6(4): 253-62.
  - [17] Nigro G, Comi LI, Politano L, Bain RJ. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol*. 1990; 26(3): 271-7.
  - [18] Cox GF, Kunkel LM. Dystrophies and heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 1997; 12(3): 329-43.
  - [19] Hainsey TA, Senapati S, Kuhn DE, Rafael JA. Cardiomyopathic features associated with muscular dystrophy are independent of dystrophin absence in cardiovascular. *Neuromuscul Disord*. 2003; 13(4): 294-302.
  - [20] Zhu X, Wheeler MT, Hadhazy M, Lam MY, McNally EM. Cardiomyopathy is independent of skeletal muscle disease in muscular dystrophy. *Faseb J*. 2002; 16(9): 1096-8.
  - [21] de Kermadec JM, Becane HM, Chenard A, Tertrain F, Weiss Y. Prevalence of left ventricular systolic dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: an echocardiographic study. *Am Heart J*. 1994; 127(3): 618-23.
  - [22] Mukoyama M, Kondo K, Hizawa K, Nishitani H. Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan. *J Neurol Sci*. 1987; 81(2-3): 155-8.
  - [23] Quinlan JG, Hahn HS, Wong BL, Lorenz JN, Wenisch AS, Levin LS. Evolution of the *mdx* mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul Disord*. 2004; 14(8-9): 491-6.
  - [24] Bia BL, Cassidy PJ, Young ME, Rafael JA, Leighton B, Davies KE, et al. Decreased myocardial nNOS, increased iNOS and abnormal ECGs in mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31(10): 1857-62.
  - [25] Wilding JR, Schneider JE, Sang AE, Davies KE, Neubauer S, Clarke K. Dystrophin- and MLP-deficient mouse hearts: marked differences in morphology and function, but similar accumulation of cytoskeletal proteins. *FASEB J*. 2005; 19(1): 79-81.
  - [26] Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(8): 3710-4.
  - [27] Danialou G, Comtois AS, Dudley R, Karpati G, Vincent G, Des Rosiers C, et al. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. *FASEB J*. 2001; 15(9): 1655-7.
  - [28] Kamogawa Y, Biro S, Maeda M, Setoguchi M, Hirakawa T, Yoshida H, et al. Dystrophin-deficient myocardium is vulnerable to pressure overload *in vivo*. *Cardiovasc Res*. 2001; 50(3): 509-15.
  - [29] Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, Ikeda S. Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and

- calcineurin by physical exercise, in hearts of *mdx* mice. FEBS Lett. 2002; 520(1-3): 18-24.
- [30] Petrof BJ. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. Mol Cell Biochem. 1998; 179(1-2): 111-23.
  - [31] Petrof BJ. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. Am J Phys Med Rehabil. 2002; 81(11 Suppl): S162-74.
  - [32] Oceandy D, Cartwright EJ, Emerson M, Prehar S, Baudoin FM and Zi M *et al.*, Neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart is regulated by the sarcolemmal calcium pump 4b, Circulation. 2007; 115: 483-492.
  - [33] Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM and Choi SS *et al.*, Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2001; 98: 14126-14131.
  - [34] Bendall JK, Damy T, Ratajczak P, Loyer X, Monceau V and Marty I *et al.*, Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat, Circulation. 2004; 110: 2368-2375.
  - [35] Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH. Metabolic mechanisms in heart failure. Circulation. 2007; 116(4): 434-48.
  - [36] Neubauer S. The failing heart-an engine out of fuel. N Engl J Med. 2007; 356(11): 1140-51.
  - [37] Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. Physiol Rev. 2005; 85(3): 1093-129.
  - [38] van Bielsen BM, van Nieuwenhoven FA, van Der V. Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? Cardiovasc Res. 2009; 81(3): 420-8.
  - [39] Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling. Cardiovasc Res. 2009; 81(3): 412-9.
  - [40] Chandler MP, Kerner J, Huang H, Vazquez E, Reszko A, Martini WZ, et al. Moderate severity heart failure does not involve a downregulation of myocardial fatty acid oxidation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 287(4): H1538-H43.
  - [41] de Brouwer KF, Degens H, Aartsen WM, Lindhout M, Bitsch NJ, Gilde AJ, et al. Specific and sustained down-regulation of genes involved in fatty acid metabolism is not a hallmark of progression to cardiac failure in mice. J Mol Cell Cardiol. 2006; 40(6): 838-45.
  - [42] Borradaile NM, Schaffer JE. Lipotoxicity in the heart. Curr Hypertens Rep. 2005; 7(6): 412-7.
  - [43] Gelinas R, Labarthe F, Bouchard B, Mc DJ, Charron G, Young ME, et al. Alterations in carbohydrate metabolism and its regulation in PPARalpha null mouse hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008; 294(4): H1571-H80.
  - [44] Labarthe F, Khairallah M, Bouchard B, Stanley WC, Des RC. Fatty acid oxidation and its impact on response of spontaneously hypertensive rat hearts to an adrenergic stress: benefits of a medium-chain fatty acid. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 288(3): H1425-H36.
  - [45] Lewin TM, Coleman RA. Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. Biochim Biophys Acta. 2003; 1634(3): 63-75.
  - [46] Russell LK, Finck BN, Kelly DP. Mouse models of mitochondrial dysfunction and heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2005; 38(1): 81-91.

- [47] Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J*. 2004; 18(14): 1692-700.
- [48] Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, et al. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta<sup>-</sup>-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(7): 4586-91.
- [49] Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM, et al. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(2): 907-12.
- [50] Khairallah RJ, Khairallah M, Gelinas R, Bouchard B, Young ME, Allen BG, et al. Cyclic GMP signaling in cardiomyocytes modulates fatty acid trafficking and prevents triglyceride accumulation. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Aug; 45(2): 230-9.
- [51] Allard MF, Wambolt RB, Longnus SL, Grist M, Lydell CP, Parsons HL, et al. Hypertrophied rat hearts are less responsive to the metabolic and functional effects of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279(3): E487-E93.
- [52] Nascimben L, Ingwall JS, Lorell BH, Pinz I, Schultz V, Tornheim K, et al. Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. *Hypertension*. 2004; 44(5): 662-7.
- [53] Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev*. 2002 Apr; 7(2): 161-73.
- [54] Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science*. 2006; 312(5774): 734-7.
- [55] Yamashita H, Bharadwaj KG, Ikeda S, Park TS, Goldberg IJ. Cardiac metabolic compensation to hypertension requires lipoprotein lipase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Sep; 295(3): E705-13.
- [56] Khairallah M, Labarthe F, Bouchard B, Danialou G, Petrof BJ, Des Rosiers C. Profiling substrate fluxes in the isolated working mouse heart using <sup>13</sup>C-labeled substrates: focusing on the origin and fate of pyruvate and citrate carbons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286(4): H1461-70.
- [57] Momose M, Iguchi N, Imamura K, Usui H, Ueda T, Miyamoto K, et al. Depressed myocardial fatty acid metabolism in patients with muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2001; 11(5): 464-9.
- [58] Naruse H, Miyagi J, Arii T, Ohyanagi M, Iwasaki T, Jinnai K. The relationship between clinical stage, prognosis and myocardial damage in patients with Duchenne-type muscular dystrophy: five-year follow-up study. *Ann Nucl Med*. 2004; 18(3): 203-8.
- [59] Perloff JK, Henze E, Schelbert HR. Alterations in regional myocardial metabolism, perfusion, and wall motion in Duchenne muscular dystrophy studied by radionuclide imaging. *Circulation*. 1984; 69(1): 33-42.
- [60] Quinlivan RM, Lewis P, Marsden P, Dundas R, Robb SA, Baker E, et al. Cardiac function, metabolism and perfusion in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 1996; 6(4): 237-46.
- [61] Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Jan; 38(1): 63-71.
- [62] Young LH, Li J, Baron SJ, Russell RR. AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart. *Trends Cardiovasc Med*. 2005; 15(3): 110-8.

- [63] Barger PM, Browning AC, Garner AN, Kelly DP. p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ : a potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem.* 2001; 276(48): 44495-501.
- [64] Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull.* 2004; 62(6): 505-15.
- [65] Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2006; 69(2): 318-28.
- [66] Heydemann A, Huber JM, Kakkar R, Wheeler MT, McNally EM. Functional nitric oxide synthase mislocalization in cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 36(2): 213-23.
- [67] Wehling-Henricks M, Jordan MC, Roos KP, Deng B, Tidball JG. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(14): 1921-33.
- [68] Paulus WJ, Bronzwaer JG. Nitric oxide's role in the heart: control of beating or breathing? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287(1): H8-13.
- [69] Recchia FA. Role of nitric oxide in the regulation of substrate metabolism in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2002; 7(2): 141-8.
- [70] Henning SL, Wambolt RB, Schonekess BO, Lopaschuk GD, Allard MF. Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. *Circulation.* 1996; 93(8): 1549-55.
- [71] Lewandowski ED. Metabolic heterogeneity of carbon substrate utilization in mammalian heart: NMR determinations of mitochondrial versus cytosolic compartmentation. *Biochemistry.* 1992; 31(37): 8916-23.
- [72] Schonekess BO, Brindley PG, Lopaschuk GD. Calcium regulation of glycolysis, glucose oxidation, and fatty acid oxidation in the aerobic and ischemic heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995; 73(11): 1632-40.
- [73] Chen YW, Zhao P, Borup R, Hoffman EP. Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol.* 2000; 151(6): 1321-36.
- [74] Arany Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18(5): 426-34.
- [75] Handschin C, Kobayashi YM, Chin S, Seale P, Campbell KP, Spiegelman BM. PGC-1 $\alpha$  regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. *Genes Dev.* 2007; 21(7): 770-83.
- [76] Zhang W, ten Hove M, Schneider JE, Stuckey DJ, Sebag-Montefiore L and Bia BL *et al.*, Abnormal cardiac morphology, function and energy metabolism in the dystrophic *mdx* mouse: an MRI and MRS study, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2008; 45: 754–760.
- [77] Duchen MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol.* 1999; 516 ( Pt 1): 1-17.
- [78] Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell.* 1997; 89(7): 1145-53.
- [79] Ichas F, Jouaville LS, Sidash SS, Mazat JP, Holmuhamedov EL. Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signalling. *FEBS Lett.* 1994; 348(2): 211-5.

- [80] Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1366(1-2): 33-50.
- [81] Cadenas E, Poderoso JJ, Antunes F, Boveris A. Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Radic Res*. 2000; 33(6): 747-56.
- [82] Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*. 2001; 52(3-5): 159-64.
- [83] Poderoso JJ, Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial oxidative stress: a self-propagating process with implications for signaling cascades. *Biofactors*. 2000; 11(1-2): 43-5.
- [84] Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003; 552(Pt 2): 335-44.
- [85] Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*. 1998; 94(6): 695-8.
- [86] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004; 305(5684): 626-9.
- [87] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998; 281(5381): 1309-12.
- [88] Mattson MP, Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med*. 2003; 9(5): 196-205.
- [89] Waterhouse NJ, Ricci JE, Green DR. And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie*. 2002; 84(2-3): 113-21.
- [90] Zoratti M, Szabo I, De Marchi U. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1706(1-2): 40-52.
- [91] Ozcan C, Bienengraeber M, Hodgson DM, Mann DL, Terzic A. Mitochondrial tolerance to stress impaired in failing heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2003; 35(9): 1161-6.
- [92] Sabbah HN, Sharov V, Riddle JM, Kono T, Lesch M, Goldstein S. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1992; 24(11): 1333-47.
- [93] Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla HR, Wiegand V. Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 1990; 11(6): 509-16.
- [94] Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res*. 2001; 88(5): 529-35.
- [95] Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res*. 1999 Aug 20; 85(4): 357-63.
- [96] Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, et al. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2000; 45(4): 860-5.
- [97] Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L, Karmazyn M. NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 38(1): 135-43.
- [98] Moe GW, Marin-Garcia J, Konig A, Goldenthal M, Lu X, Feng Q. *In vivo* TNF-alpha inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction,



- oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287(4): H1813-20.
- [99] Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, et al. Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 40(12): 2174-81.
  - [100] Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2000; 32(12): 2361-7.
  - [101] Sordahl LA, McCollum WB, Wood WG, Schwartz A. Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Am J Physiol*. 1973; 224(3): 497-502.
  - [102] Guarnieri C, Muscari C, Caldarera CM. Oxygen radicals and tissue damage in heart hypertrophy. *Adv Myocardiol*. 1985; 5: 191-9.
  - [103] Kobayashi A, Yamashita T, Kaneko M, Nishiyama T, Hayashi H, Yamazaki N. Effects of verapamil on experimental cardiomyopathy in the Bio 14.6 Syrian hamster. *J Am Coll Cardiol*. 1987; 10(5): 1128-38.
  - [104] Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Pierpont EM, Ananthakrishnan R, Perez-Atayde A. Is age a contributory factor of mitochondrial bioenergetic decline and DNA defects in idiopathic dilated cardiomyopathy? *Cardiovasc Pathol*. 1999; 8(4): 217-22.
  - [105] Matsushima S, Ide T, Yamato M, Matsusaka H, Hattori F, Ikeuchi M, et al. Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2006; 113(14): 1779-86.
  - [106] Moe GW, Naik G, Konig A, Lu X, Feng Q. Early and persistent activation of myocardial apoptosis, bax and caspases: insights into mechanisms of progression of heart failure. *Pathophysiology*. 2002; 8(3): 183-92.
  - [107] Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997; 336(16): 1131-41.
  - [108] Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkila P, Laine P, Mattila S, et al. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29(5): 380-6.
  - [109] Sharov VG, Todor A, Khanal S, Imai M, Sabbah HN. Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improves mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 42(1): 150-8.
  - [110] Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, et al. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(14): 8144-9.
  - [111] Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, Drogaris K, Darmer D, et al. Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: fragile balance of myocyte survival? *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39(3): 481-8.
  - [112] Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*. 2004; 95(10): 957-70.
  - [113] Marcil M, Ascah A, Matas J, Belanger S, Deschepper CF, Burelle Y. Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41(6): 998-1009.

- [114] Matas J, Young NT, Bourcier-Lucas C, Ascah A, Marcil M, Deschepper CF, et al. Increased expression and intramitochondrial translocation of cyclophilin-D associates with increased vulnerability of the permeability transition pore to stress-induced opening during compensated ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 46(3): 420-30.
- [115] Kang PM, Yue P, Liu Z, Tarnavski O, Bodyak N, Izumo S. Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287(1): H72-80.
- [116] Allard MF, Flint JD, English JC, Henning SL, Salamanca MC, Kamimura CT, et al. Calcium overload during reperfusion is accelerated in isolated hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1994; 26(12): 1551-63.
- [117] Anderson PG, Allard MF, Thomas GD, Bishop SP, Digerness SB. Increased ischemic injury but decreased hypoxic injury in hypertrophied rat hearts. *Circ Res.* 1990; 67(4): 948-59.
- [118] Gaasch WH, Zile MR, Hoshino PK, Weinberg EO, Rhodes DR, Apstein CS. Tolerance of the hypertrophic heart to ischemia. Studies in compensated and failing dog hearts with pressure overload hypertrophy. *Circulation.* 1990; 81(5): 1644-53.
- [119] Ciminelli M, Ascah A, Bourduas K, Burelle Y. Short Term Training Attenuates Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Without Affecting Myocardial Function Following Ischemia-Reperfusion. *Mol Cell Biochem.* 2006; 291(1-2):39-47.
- [120] Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 1995; 307 ( Pt 1): 93-8.
- [121] Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med.* 2008; 14(4): 442-7.
- [122] Hicks D, Lampe AK, Laval SH, Allamand V, Jimenez-Mallebrera C and Walter MC *et al.*, Cyclosporine A treatment for Ullrich congenital muscular dystrophy: a cellular study of mitochondrial dysfunction and its rescue, *Brain.* 2009; 132: 147–155.
- [123] Angelin A, Tiepolo T, Sabatelli P, Grumati P, Bergamin N and Golfieri C *et al.*, Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104: 991–996.
- [124] Reutenauer J, Dorchies OM, Patthey-Vuadens O, Vuagniaux G and Ruegg UT, Investigation of Debio 025, a cyclophilin inhibitor, in the dystrophic *mdx* mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy, *Br. J. Pharmacol.* 2008; 155: 574–584.
- [125] Gneccchi-Ruscone T, Taylor J, Mercuri E, Paternostro G, Pogue R, Bushby K, et al. Cardiomyopathy in duchenne, becker, and sarcoglycanopathies: a role for coronary dysfunction? *Muscle Nerve.* 1999; 22(11): 1549-56.
- [126] Mendell JR, Engel WK, Derrer EC. Duchenne muscular dystrophy: functional ischemia reproduces its characteristic lesions. *Science.* 1971; 172(988): 1143-5.
- [127] Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1241(2): 139-76.
- [128] Gailly P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1600(1-2): 38-44.

- [129] Williams IA, Allen DG. Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from *mdx* mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292(2): H846-55.
- [130] Huang J, van Breemen C, Kuo KH, Hove-Madsen L, Tibbits GF. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry modulates sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  loading in neonatal rabbit cardiac ventricular myocytes. *American journal of physiology*. 2006; 290(6): C1572-82.
- [131] Robert V, Massimino ML, Tosello V, Marsault R, Cantini M, Sorrentino V, et al. Alteration in calcium handling at the subcellular level in *mdx* myotubes. *J Biol Chem*. 2001; 276(7): 4647-51.
- [132] Vandebrouck A, Ducret T, Basset O, Sebille S, Raymond G, Ruegg U, et al. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. *FASEB J*. 2006; 20(1): 136-8.
- [133] Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, Mongillo M, Liu X, Rothman L, et al. Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med*. 2009; 15(3): 325-30.
- [134] Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T. Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{IP}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. 1993; 262(5134): 744-7.
- [135] Robert V, Gurlini P, Tosello V, Nagai T, Miyawaki A, Di Lisa F, et al. Beat-to-beat oscillations of mitochondrial  $[\text{Ca}^{2+}]$  in cardiac cells. *EMBO J*. 2001; 20(17): 4998-5007.
- [136] Gilibert JA, Parekh AB. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current  $\text{I}(\text{CRAC})$ . *EMBO J*. 2000; 19(23): 6401-7.
- [137] Dudley RW, Khairallah M, Mohammed S, Lands L, Des Rosiers C, Petrof BJ. Dynamic responses of the glutathione system to acute oxidative stress in dystrophic mouse (*mdx*) muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 291(3): R704-10.
- [138] Kuznetsov AV, Winkler K, Wiedemann FR, von Bossanyi P, Dietzmann K, Kunz WS. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient *mdx* mouse. *Mol Cell Biochem*. 1998; 183(1-2): 87-96.
- [139] Fisher PW, Salloum F, Das A, Hyder H, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation*. 2005; 111(13): 1601-10.
- [140] Ockaili R, Salloum F, Hawkins J, Kukreja RC. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial  $\text{K}(\text{ATP})$  channels in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283(3): H1263-9.
- [141] Salloum F, Yin C, Xi L, Kukreja RC. Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. *Circ Res*. 2003; 92(6): 595-7.
- [142] Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, et al. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res*. 2005; 97(4): 329-36.
- [143] Costa AD, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jaburek M, Garlid KD. The direct physiological effects of  $\text{mitoK}(\text{ATP})$  opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290(1): H406-15.
- [144] Das A, Salloum FN, Xi L, Rao YJ, Kukreja RC. ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-

- reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296(5): H1236-H43.
- [145] Mendelsohn ME. Viagra: now mending hearts. *Nat Med*. 2005 Feb; 11(2): 115-6.
  - [146] Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*. 2003; 35(1): 21-7.
  - [147] Yue Y, Li Z, Harper SQ, Davisson RL, Chamberlain JS, Duan D. Microdystrophin gene therapy of cardiomyopathy restores dystrophin-glycoprotein complex and improves sarcolemma integrity in the *mdx* mouse heart. *Circulation*. 2003; 108(13): 1626-32.
  - [148] Perkins KJ, Davies KE. The role of utrophin in the potential therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2002; 12 Suppl 1: S78-89.
  - [149] Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1997; 90(4): 717-27.
  - [150] Janssen PM, Hiranandani N, Mays TA, Rafael-Fortney JA. Utrophin deficiency worsens cardiac contractile dysfunction present in dystrophin-deficient *mdx* mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289(6): H2373-8.
  - [151] McNally EM. New approaches in the therapy of cardiomyopathy in muscular dystrophy. *Annu Rev Med*. 2007; 58: 75-88.
  - [152] Jung C, Martins AS, Niggli E, Shirokova N. Dystrophic cardiomyopathy: amplification of cellular damage by Ca<sup>2+</sup> signalling and reactive oxygen species-generating pathways. *Cardiovasc Res*. 2008; 77(4): 766-73.
  - [153] Connern CP, Halestrap AP. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochem J*. 1994; 302 (Pt 2): 321-4.
  - [154] Connern CP, Halestrap AP. Chaotropic agents and increased matrix volume enhance binding of mitochondrial cyclophilin to the inner mitochondrial membrane and sensitize the mitochondrial permeability transition to [Ca<sup>2+</sup>]. *Biochemistry*. 1996; 35(25): 8172-80.
  - [155] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999; 341 ( Pt 2): 233-49.
  - [156] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004; 61(3): 372-85.
  - [157] Morioka M, Hamada J, Ushio Y, Miyamoto E. Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury. *Prog Neurobiol*. 1999; 58(1): 1-30.
  - [158] Nishinaka Y, Sugiyama S, Yokota M, Saito H, Ozawa T. Protective effect of FK506 on ischemia/reperfusion-induced myocardial damage in canine heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 21(3): 448-54.
  - [159] Ruiz F, Alvarez G, Ramos M, Hernandez M, Bogonez E, Satrustegui J. Cyclosporin A targets involved in protection against glutamate excitotoxicity. *Eur J Pharmacol*. 2000; 404(1-2): 29-39.
  - [160] Backman E, Nylander E, Johansson I, Henriksson KG, Tagesson C. Selenium and vitamin E treatment of Duchenne muscular dystrophy: no effect on muscle function. *Acta Neurol Scand*. 1988; 78(5): 429-35.
  - [161] Tidball JG, Wehling-Henricks M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol*. 2007; 102(4): 1677-86.

- [162] Buyse GM, Van der Mieren G, Erb M, D'Hooge J, Herijgers P, Verbeken E, et al. Long-term blinded placebo-controlled study of SNT-MC17/idebenone in the dystrophin deficient *mdx* mouse: cardiac protection and improved exercise performance. *Eur Heart J*. 2009; 30(1): 116-24.
- [163] Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. 2005; 19(9): 1088-95.
- [164] Jauslin ML, Meier T, Smith RA, Murphy MP. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *FASEB J*. 2003; 17(13): 1972-4.
- [165] Parchen MC, Percival JM, Dao-Fu D, Gray HN, Frohner SC, Beavo JA. Sildenafil Ameliorates Cardiomyopathy in *mdx* Mice. *FASEB Journal*. 2009; 23(823.1 meeting abstract).
- [166] Asai A, Sahani N, Kaneki M, Ouchi Y, Martyn JA, Yasuhara SE. Primary role of functional ischemia, quantitative evidence for the two-hit mechanism, and phosphodiesterase-5 inhibitor therapy in mouse muscular dystrophy. *PLoS ONE*. 2007; 2(8): e806.
- [167] Kyoi S, Otani H, Hamano A, Matsuhisa S, Akita Y, Fujiwara H, et al. Dystrophin is a possible end-target of ischemic preconditioning against cardiomyocyte oncosis during the early phase of reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2006; 70(2): 354-63.

**Table 1.** Comparison of metabolic flux and physiological parameters assessed in 12-week-old C57BL/10 and *mdx* mouse hearts perfused with  $^{13}\text{C}$ -labeled substrates.

Measured Parameters	<i>mdx</i> vs. C57BL/10 (ratio)
<b>1. Metabolic flux parameters assessed at 30 min</b> A) <i>Cytosolic</i> - Glycolysis (production of lactate and pyruvate) B) <i>Mitochondria</i> i) Relative contribution of substrates to citrate synthesis - Carbohydrate oxidation: Pyruvate decarboxylation (PDC/CS) - Fatty acid oxidation: Oleate $\beta$ -oxydation (OLE/CS) - Oxidation of other substrates (OS/CS) - Anaplerosis: Pyruvate carboxylation (PC/CS) ii) Citric acid cycle-related parameters - Citric acid cycle intermediate levels - Aconitase activity - Citrate synthase activity - Calculated ATP production rates	  $\uparrow(1.62)^*$   $\uparrow(2.20)^{**}$ $\downarrow(0.73)^*$ NS $\downarrow(0.81)^*$  $\downarrow(0.66)^{**}$ $\downarrow(0.72)^*$ NS $\uparrow(1.17)^*$
<b>2. Physiological parameters assessed at 25-30 min</b> - Aortic flow - Coronary flow - Left ventricular systolic pressure - Left ventricular end diastolic pressure - Heart rate - $dP/dt_{\max}$ - $dP/dt_{\min}$ - Oxygen consumption - Lactate dehydrogenase release	 $\uparrow(0.83)^*$ NS $\downarrow(0.90)^*$ NS NS $\downarrow(0.84)^{**}$ $\downarrow(0.87)^*$ $\uparrow(1.18)^{**}$ $\uparrow(2.60)^{**}$

Metabolic and functional data are from Khairallah et al. [8]. The following metabolic parameters were assessed in working hearts perfused for 30 min with physiological concentrations of carbohydrates (11 mM glucose, 1.5 mM lactate and 0.2 mM pyruvate) and a fatty acid (0.4 mM oleate bound to albumin) using  $^{13}\text{C}$ -labeled

substrates and mass isotopomer analysis by gas chromatography-mass spectrometry: **A.** Glycolysis reflecting the production of lactate and pyruvate from  $^{13}\text{C}$ -glucose ( $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ ). **B.i.** Substrate flux ratios reflecting the contribution of exogenous fatty acids (oleate) and carbohydrates (CHOs: lactate, pyruvate and glucose) to acetyl-CoA formation (energy) and oxaloacetate (OAA, anaplerosis) via oleate  $\beta$ -oxidation (OLE), pyruvate decarboxylation (PDC) and carboxylation (PC), respectively, expressed relative to citrate synthesis (CS); **B.ii.** Tissue concentration of citric acid cycle (CAC) intermediates (in  $\mu\text{mol} \times \text{g wet weight}^{-1}$ ), tissue aconitase and citrate synthase activity ( $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg protein}^{-1}$ ) and calculated ATP production rates. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.001$  for *mdx* versus control mouse hearts; NS: not significant.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: Mitochondrial vulnerability to permeability transition pore (PTP) opening in 12 week-old *mdx* mice.**

PTP opening was quantified *in situ* in isolated-Langendorff perfused hearts from *mdx* and C57BL/10 mice using an adaptation of the mitochondrial [ $^3$ H]-2-deoxyglucose (DOG) entrapment technique previously described for rat hearts [113,119]. As depicted in panel A, this method relies on the fact that [ $^3$ H]DOG accumulates in the cytosol of cardiomyocytes as [ $^3$ H]DOG-6-phosphate (P) and does not enter mitochondria unless PTP opening occurs. Therefore, quantification of [ $^3$ H]DOG-6P levels in mitochondria isolated at the end of perfusion provides a quantitative index of the number of mitochondria in which PTP opening occurred during the experiment. Specifically, hearts from control and *mdx* mice were initially perfused for 15 min in the non-recirculating mode with a buffer containing 0.5 mM [ $^3$ H]DOG (10  $\mu$ Ci/mL) to load the cardiomyocytes with this tracer. Then, following a 5-min washout of extracellular [ $^3$ H]DOG, hearts were submitted to 20 min of low-flow ischemia (10 % initial coronary flow) followed by 40 min reperfusion in presence of 1  $\mu$ M norepinephrine. Prior to ischemia (I), *mdx* hearts showed no major contractile dysfunction as reflected by the rate pressure product (RPP = Left ventricular developed pressure in mmHg x heart rate in beats per min) (Panel C) but released greater amounts of lactate dehydrogenase (LDH; values normalized for contractile function) in the coronary effluent compared to controls (Panel D). However, at reperfusion (R), *mdx* heart displayed: (i) poorer functional recovery (Panel C), (ii) enhanced LDH release (Panel D), (iii) greater opening of the PTP (Panel B), and (iv) greater release of cytochrome c (Cyt-c) into the cytosolic fraction (Panel E). Data represent means  $\pm$  SEM, n = 10-11 per group. \* p < 0.05 vs. control C57BL/10 mice.



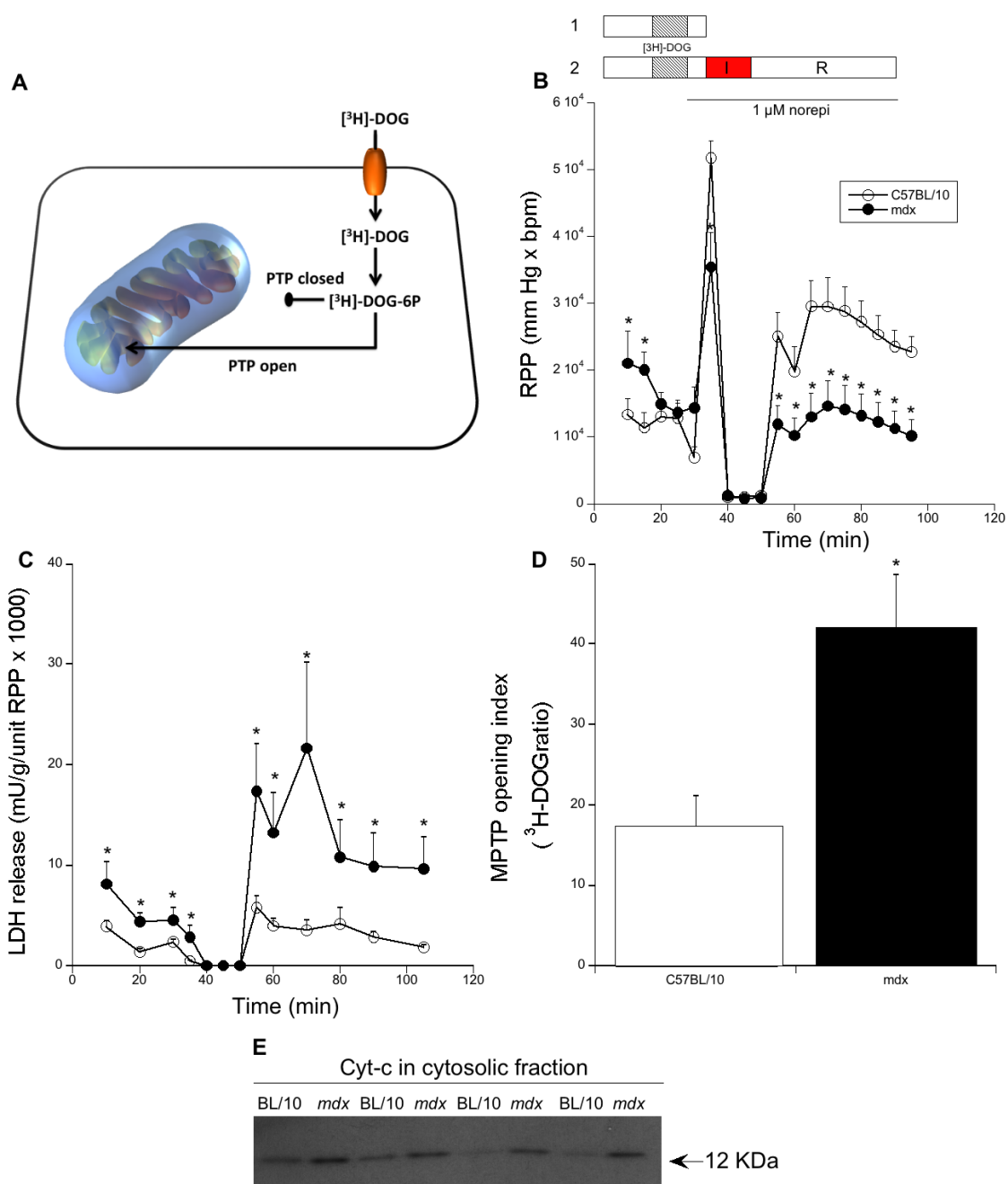
**Figure 2: Mitochondrial oxidative stress in *mdx* mouse hearts.**

Panel A shows the activity of the mitochondrial oxidative stress marker, aconitase, measured in tissue homogenates prepared from either freshly isolated 12 week-old mouse hearts or perfused *ex vivo* in the working mode [8]. Data are expressed in percentage of values measured in control animals (C57BL/10) and represent means  $\pm$  SEM, n = 6-11 per group. Panel B shows the results of experiments in which changes in respiration ( $\text{JO}_2$ ) were recorded in response to the sequential addition of glutamate-malate (5:2.5 mM), ADP (1 mM), rotenone (1  $\mu\text{M}$ ), succinate (5 mM), and carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP: 0.1  $\mu\text{M}$ ). Data shown in panel B are expressed per mg of total protein and represent means  $\pm$  SEM, n = 4-6 per group. \*  $p < 0.05$  vs. control C57BL/10 mice.

**Figure 3: Simplified integrated mechanistic scheme of potential players and consequences of early mitochondrial dysfunction in the dystrophin-deficient heart.**

Refer to Section 6 for details. Abbreviations: nNOS, neuronal nitric oxide synthase;  $\text{Ca}^{2+}$ , calcium; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; PTP, permeability transition pore; CAC, citric acid cycle.

Figure 1



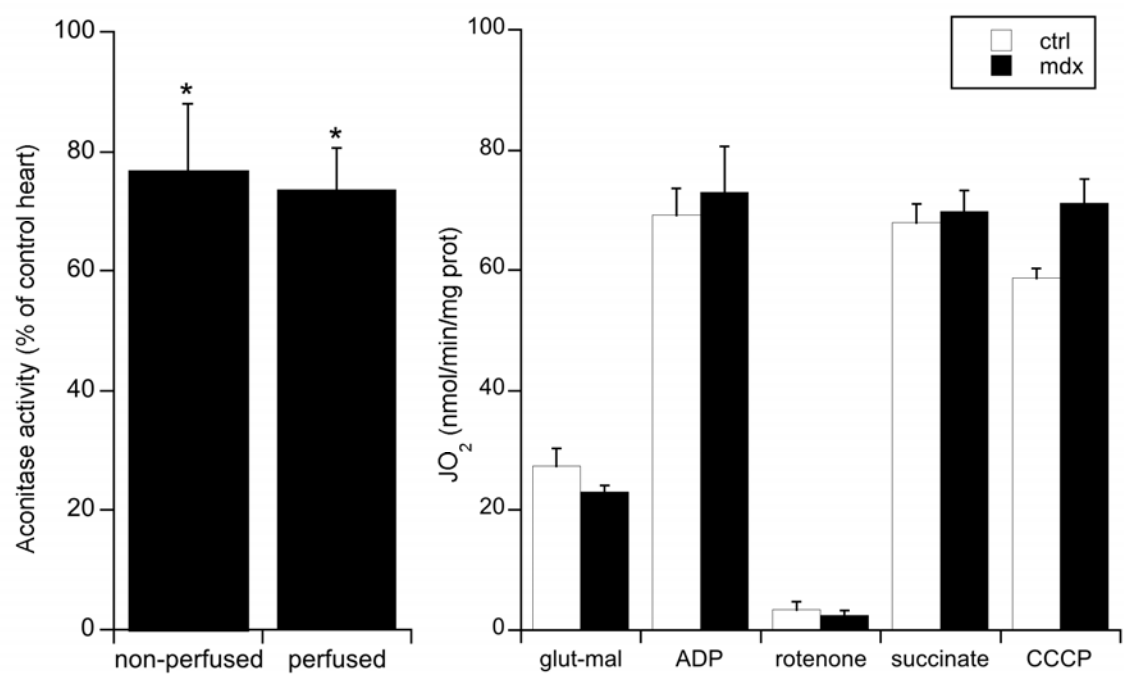
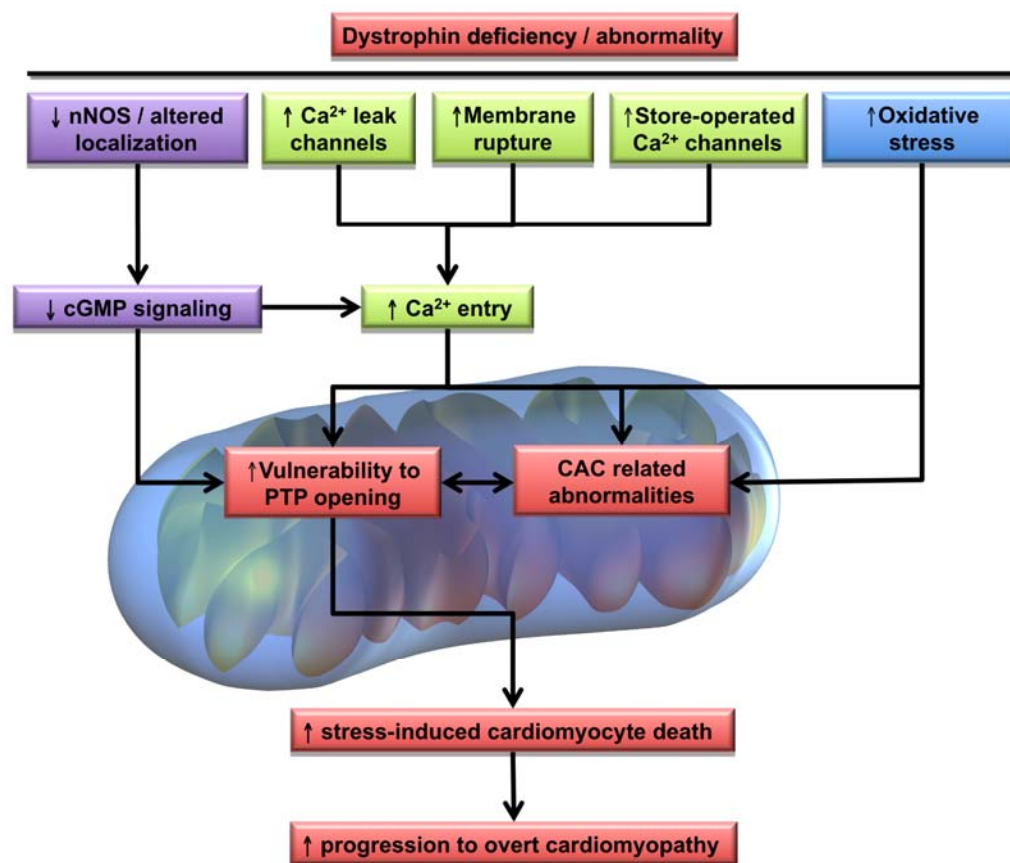
**Figure 2**

Figure 3



### 5.3 Article 3

#### Titre

Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil.

#### Auteurs

Alexis Ascah, Maya Khairallah, Frédéric Daussin, Céline Bourcier-Lucas, Richard Godin, Bruce G. Allen, Basil J. Petrof, Christine Des Rosiers and Yan Burelle

#### Journal

Publié le 1<sup>er</sup> janvier 2011 dans le *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. (Am J Physiol Heart Circ Physiol.)

Reproduit avec la permission de The American Physiological Society

**Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil.**

Alexis Ascah, Maya Khairallah, Frédéric Daussin, Céline Bourcier-Lucas, Richard Godin, Bruce G. Allen, Basil J. Petrof, Christine Des Rosiers and Yan Burelle

**Running head:** Sildenafil in dystrophic hearts

**Word count:** 4 949

---

From the Montreal Heart Institute (M.K., B.G.A., C.D.R.), and the Departments of Kinesiology (Y.B., A.A., F.D., C.B.L., R.G.), Nutrition and Biochemistry (M.K., B.G.A., C.D.R.), and Medicine (B.G.A.), Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada.

Meakins-Christie Laboratories and Respiratory Division, McGill University, Montreal, Quebec, H3A 1A1, Canada (B.J.P.).

**Send correspondence to:**

Yan Burelle, Ph.D, Université de Montréal.

## ABSTRACT

**Aims:** Susceptibility of cardiomyocytes to stress-induced damage has been implicated in the development of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy (DMD), a disease caused by lack of the cytoskeletal protein dystrophin in which heart failure is frequent. However, the factors underlying disease progression are unclear and treatments limited. Here, we tested the hypothesis of a greater susceptibility to opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) in hearts from young dystrophic (*mdx* mice) (prior to development of overt cardiomyopathy) when subjected to a stress protocol, and determined whether prevention of PTP opening is involved in the cardio protective effect of sildenafil, which we have previously reported in *mdx* mice.

**Methods and results:** Using the [ $^3\text{H}$ ]-DOG method to quantify PTP opening in *ex vivo* perfused hearts, we demonstrate that, compared to controls, hearts from young *mdx* mice subjected to ischemia-reperfusion (I-R) display excessive PTP opening as well as enhanced activation of cell death signaling, mitochondrial oxidative stress, cardiomyocyte damage and poorer recovery of contractile function. Functional analyses in permeabilized cardiac fibers from non-ischemic hearts revealed that *in vitro* mitochondria from *mdx* hearts display normal respiratory function and ROS handling, but enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake velocity, and premature opening of the PTP, which may predispose to I-R-induced injury. Administration of a single dose of sildenafil to *mdx* mice, prior to I-R prevented excessive PTP opening and its downstream consequences, and reduced tissue  $\text{Ca}^{2+}$  levels. Furthermore, mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake velocity was reduced following sildenafil treatment.

**Conclusion:** Beyond documenting that an increased susceptibility to opening of the mitochondrial PTP in the *mdx* heart occurs well before clinical signs of overt cardiomyopathy, our results demonstrate that sildenafil, which is already

administered in other pediatric populations, and is reported safe and well-tolerated, provides efficient protection against this deleterious event, likely by reducing cellular  $\text{Ca}^{2+}$  loading, and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake.

**Keywords:** Duchenne muscular dystrophy, cardiomyopathy, mitochondria, permeability transition pore, PDE-5 inhibitors.

## INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an inherited X-linked disease resulting from mutations in the dystrophin gene located at Xp21, which leads to the absence of this cytoskeletal protein in striated muscle cells. Although the first clinical manifestations are generally related to skeletal muscle weakness, cardiac involvement is inescapable with age and frequently progresses toward heart failure [14,39]. While it has been suggested that the abnormally high susceptibility of dystrophin-deficient cardiomyocytes to load-induced injury observed prior to clinical signs of cardiomyopathy plays a role in disease progression, the underlying pathogenic mechanisms remain unclear [13,29]. Moreover, despite the progress made in the development of gene and cell replacement strategies to correct dystrophin deficiency, few therapeutic avenues are currently available to patients beyond conventional heart failure therapy [35].

In previous studies, we explored the potential benefits of enhancing cGMP signaling using the phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitor sildenafil in the dystrophin-deficient *mdx* mouse [29], the most widely used model of DMD. In this model, there is a pronounced reduction of neuronal NO synthase (nNOS) activity in skeletal muscle and the heart [5,22,55]. We showed that administration of sildenafil to young *mdx* mice prior to any clinical signs of cardiomyopathy reduced



cardiomyocyte necrosis in response to acute *in vivo* administration of a  $\beta$ -adrenergic agonist [29]. A greater resistance to stress-induced injury was also observed in isolated working hearts from *mdx* mice harboring cardiac-specific overexpression of a soluble guanylate cyclase transgene (*mdx*-sGC<sup>+/0</sup>), suggesting that the benefits of sildenafil in the dystrophin-deficient heart were likely related to restoration of cGMP signaling specifically downstream of NO [29]. However the underlying mechanisms and the ultimate cellular end-effectors responsible for this protection remain unclear.

Recent studies have provided evidence for mitochondrial involvement in cardiomyocyte injury found in dystrophic hearts. More specifically, Millay et al. [37] showed that genetic ablation of the PTP-sensitizing protein cyclophilin-D in  $\delta$ -sarcoglycan (*scgd*<sup>-/-</sup>) and laminin-2 (*lama*<sup>-/-</sup>)-null mice, severe models of MD, reduced cardiac fibrosis and improved ejection fraction as well as survival, suggesting a role for opening of the permeability transition pore (PTP) in the development of cardiomyopathy in these models. Studies performed in skeletal muscle in various models of MD including DMD, Bethlem myopathy, Ullrich congenital dystrophy, and Limb-girdle MD have also implicated the PTP in the pathological phenotype of skeletal muscle [2,43]. However, this has not been firmly established in the heart. Moreover, it is unclear whether mitochondrial functional abnormalities are present prior to the development of overt cardiomyopathy.

As we suggested recently [9], prevention of PTP opening could constitute a mechanism by which sildenafil protects the dystrophin-deficient heart against cardiomyocyte damage in response to stress. In fact, activation of cGMP signaling by sildenafil could potentially inhibit PTP opening indirectly through modulation of key cellular regulators of the PTP, such as intracellular Ca<sup>2+</sup> levels and oxidative stress

[58], which are increased in DMD [53]. In addition, based on the fact that recombinant protein kinase G (PKG, a downstream kinase of cGMP) has the capacity to inhibit opening of the PTP in isolated mitochondria [18], sildenafil could also inhibit PTP opening by altering mitochondrial function directly. However, the effect of sildenafil on PTP opening in the *mdx* heart has not been assessed. This is of potential clinical interest given that treatment with PTP inhibitors is a suggested avenue of treatment in DMD [37], and sildenafil, which is already in use for treatment of pulmonary hypertension in children, is safe and well-tolerated.

Therefore, in the present study, we determined whether prevention of mitochondrial PTP opening is involved in the protective effect of sildenafil against stress-induced damage induced by ischemia-reperfusion in the intact perfused *mdx* mouse heart. Similar to our previous studies [29], we used 12-week-old *mdx* mouse because at this young age, no echocardiographic and histological abnormalities have been reported. We also characterized mitochondrial function using permeabilized cardiac fiber bundles from non-perfused hearts to investigate whether functional abnormalities could predispose mitochondria from *mdx* hearts to increased PTP opening when subjected to a stress protocol *ex vivo*.

## METHODS

### Animal care and drug treatment:

All experiments were approved by the Université de Montréal Institutional Animal Care Committee and conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care. The male *mdx* and C57BL/10<sup>ScSn</sup> mice used originated from a colony maintained at the Royal Victoria Hospital (Montreal, Canada). All experiments were conducted at 12 weeks of age, a time at which no

echocardiographic and histological abnormalities were reported by our group [28,29] and others [42,56]. Thirty minutes prior to anesthesia (ketamine/xylazine: 9 and 1 mg/100 g body weight), *mdx* and control C57BL/10<sup>ScSn</sup> mice were administered a single injection of sildenafil citrate (Pfizer, Canada) at a clinically relevant dose (0.7 mg/kg i.p.) dissolved in saline, or the vehicle alone.

### **Isolated heart perfusion:**

Hearts were isolated and perfused in the Langendorff mode using a slightly modified version [9] of our previously described method [33]. Briefly, hearts were submitted to 35 min of normoxia, 30 min of low-flow ischemia (10% of pre-ischemic flow), and 40 min of reperfusion (Figure 1). Norepinephrine (100  $\mu$ M) was infused during the entire I-R protocol starting 5 min prior to ischemia to induce mechanical stress. Contractile function was monitored continuously by means of a fluid-filled balloon inserted in the left ventricle. Coronary effluent was collected at 10-min interval for measurements of coronary flow and determination of lactate dehydrogenase (LDH) release.

### **Measurement of PTP opening in the intact heart with 2-deoxy [<sup>3</sup>H]glucose:**

PTP opening was assessed using an adaptation of the mitochondrial 2-deoxy [<sup>3</sup>H]glucose ([<sup>3</sup>H]-DOG) entrapment method originally described in [33]. Cardiomyocytes were loaded with [<sup>3</sup>H]DOG prior to ischemia by perfusing hearts for 20 min with Krebs-Henseleit (KH) buffer (in mM: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose, 1.5 lactate, 0.2 pyruvate, and 0.8 nM insulin) supplemented with 0.5 mM (1.0  $\mu$ Ci) [<sup>3</sup>H]DOG (Figure 1). Washout of extracellular [<sup>3</sup>H]DOG was then achieved by perfusing hearts with normal KH for 5 min prior to I-R. At the end of perfusion, hearts were homogenized and mitochondria isolated.

The mitochondrial entrapment of [ $^3\text{H}$ ]-DOG, which reflects the extent of PTP opening that occurred during I-R, was expressed as follows:

$$\text{DOG index} = 10^5 \times (\text{mitochondrial } [^3\text{H}]\text{DOG} / \text{tissue } [^3\text{H}]\text{DOG}) / \text{CS recovery}.$$

where mitochondrial and tissue [ $^3\text{H}$ ]-DOG are expressed in d.p.m per unit of CS and d.p.m per g of wet ventricular tissue respectively. This calculation thus allows mitochondrial [ $^3\text{H}$ ]-DOG entrapment to be normalized for the concentration of mitochondria present in the mitochondrial fraction, and for possible differences in the tissue uptake of the tracer. In addition, this index was corrected by the amount of CS recovered in the mitochondrial fraction per gram of ventricle, which is an indicator of mitochondrial yield [26]. In the present study no differences between experimental groups were however noted for CS recovery ( $3.1 \pm 0.5$ ,  $2.9 \pm 0.3$  and  $3.7 \pm 0.5$ , mU/min/g ventricular wet weight in control, *mdx* and *mdx*+sil respectively,  $n = 10$ -12 per group,  $P = \text{NS}$ ), presumably because ischemia was less severe (10 % of baseline coronary flow) than in previous studies (no flow) [11,26].

#### **Isolation of cellular fractions for biochemical assays:**

For all the biochemical assays described below, separate perfusions were performed exactly as described above, except that [ $^3\text{H}$ ]-DOG was omitted. At the end of each perfusion, the heart was homogenized using standard procedures for the isolation of the crude cytosolic and mitochondrial fractions [47].

### **Tissue $\text{Ca}^{2+}$ content:**

Total  $\text{Ca}^{2+}$  content in the whole heart homogenate was measured spectrophotometrically on a plate reader using an O-Cresolphthalein Complexone assay [34]. Results were expressed in nmoles  $\text{Ca}^{2+}$  / mg protein.

### **Activity of caspases and aconitase:**

Caspase activity in the whole heart homogenate was measured fluorimetrically on a plate reader using specific substrates for caspase 3 and caspase 9 (Ac-DEVD-AFC and Ac-LEHD-AFC respectively). Activity was expressed as  $\Delta$ fluorescence/sec/unit of LDH released. Normalization per unit of LDH released in the coronary effluent was used to take into account that caspases are released along with LDH from cells that lose their membrane integrity [21]. In fact, preliminary studies showed a strong inverse relationship ( $r^2 = -0,62$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 18$ ) between the amount of LDH released in the coronary effluent during I-R, and caspase activity measured in the whole tissue at the end of perfusion. The activity of aconitase, a specific marker of mitochondrial oxidative stress, was measured spectrophotometrically in whole heart homogenates using a coupled enzyme assay [28].

### **Release of pro-apoptotic factors:**

Quantification of mitochondrial pro-apoptotic factors in the crude cytosolic fraction was performed by immunoblotting using previously published procedures [34]. Briefly, 7  $\mu\text{g}$  of protein were resolved on 12.5% polyacrylamide mini-gels and transferred to a PVDF membrane. Equal sample loading was confirmed by Ponceau S stain. Membranes were then fixed for 10 min with 0.05% glutaraldehyde in tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBS-T), blocked for 90 min in TBS-T

supplemented with 5 % BSA or non-fat milk, and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against AIF (Abcam), Smac/Diablo (Santa Cruz Biotechnology), cytochrome c (Invitrogen) and LDH (Santa Cruz Biotechnology). Following incubation with the secondary antibody, bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham) and quantified by ImageJ software.

### **Preparation of permeabilized myofiber and ghost fiber bundles:**

Dissection and permeabilization of cardiac fiber bundles from freshly isolated hearts was performed as previously described [41]. Briefly, fiber bundles were sampled from the endocardial portion of the left ventricle, separated with sharpened forceps under a dissecting microscope and permeabilized by incubation with saponin (50 µg/mL) during 30 min. Ghost fibers devoid of myosin were prepared by incubating saponin-permeabilized bundles in a high KCl medium, which allows for the extraction of myosin [41]. Permeabilized bundles and ghost fiber bundles were then kept on ice until use (within 6 hours). All mitochondrial parameters described below were determined at least in duplicate in permeabilized fibers from every heart.

### **Mitochondrial functional assessment:**

Mitochondrial function was studied using previously established procedures [1,41]. Briefly, mitochondrial respiration was measured polarographically in permeabilized bundles (1-2 mg dry weight) incubated in 1 mL of respiration buffer (in mM: 2.77 CaK<sub>2</sub>EGTA, 7.23 K<sub>2</sub>EGTA, 1.38 MgCl<sub>2</sub>, 20 taurine, 0.5 DTT, 100 K-MES, mM imidazole, 3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.3, 23 °C). Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release was determined by measuring the rate of increase in Amplex-red (20 µM) fluorescence in permeabilized fibers (0.3-1.0 mg dry weight) incubated in 600 µL of K-MES buffer (in mM: 110 K-MES, 35 KCl, 1 EGTA, 5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, and 0.5mg/ml

BSA, pH 7.3, 37 °C) supplemented with 1.2 U/mL horseradish peroxidase [1,41] . The sequence of respiratory substrates and inhibitors used in these experiments is detailed in the appropriate figure legends. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging capacity was measured in parallel experiments in K-MES buffer supplemented with 50 μM pyruvate and 20 μM malate by measuring the rate of decline of Amplex red fluorescence following addition of 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to permeabilized fibers [1]. The velocity of Ca<sup>2+</sup> uptake by mitochondria, and the sensitivity to Ca<sup>2+</sup>-induced PTP opening were determined fluorimetrically in ghost fibers using Ca-green5N [41]. Briefly, fibers incubated in a sucrose buffer (250 mM sucrose, 10 mM MOPS, 10 mM Pi-Tris, 5mM glutamate, 2.5 mM malate, 0.5 nM oligomycin, 5 mM succinate, 5 μM EGTA and 1 μM Ca-green5N) were exposed to a single pulse (20 nmoles) of exogenous Ca<sup>2+</sup>. The rate of Ca<sup>2+</sup> uptake by mitochondria during the first 300 sec, and the time required to observe subsequent mitochondrial Ca<sup>2+</sup> release caused by opening of the PTP, were measured. All mitochondrial functional parameters were expressed per unit of the marker enzyme CS to normalize for potential differences in mitochondrial content between samples.

#### *Statistical analyses:*

Results are expressed as means ± SEM. Statistical differences were analyzed using one-way ANOVA except for myocardial function, where the main effects of time and experimental group as well as the time-experimental group interactions were tested by repeated-measures analysis of variance (Statistica package). Tukey post hoc tests were used to identify the location of significant differences (P < 0.05). Considering the inherent variability in contractile function and response to I-R observed between sets of perfusions performed apart from each other, statistical

comparisons were only made between groups of hearts that were perfused together within a relatively short time period.

## RESULTS

### **Sildenafil selectively protects the perfused dystrophic heart against I-R induced injury and PTP opening:**

Under baseline normoxic conditions, perfused control and *mdx* hearts displayed similar values for RPP as well as negative and positive rates of pressure development (min and max dp/dt) (Figure 1). Infusion of norepinephrine starting 5 min prior to ischemia had a significant inotropic and chronotropic effect in normal hearts, but this response was significantly blunted in *mdx* hearts. Following low-flow ischemia and reperfusion, perfused hearts from *mdx* mice displayed a markedly lower recovery of RPP and  $\pm$ dp/dt. Coronary flow during reperfusion was also lower in *mdx* hearts, probably as a result of the lower contractile work performed relative to control hearts. LDH release in the coronary effluent during perfusion was significantly higher in *mdx* hearts, in agreement with our previous studies [28].

Treatment of *mdx* mice with sildenafil 30 min prior to heart perfusion led to a nearly complete normalization of the inotropic response to norepinephrine prior to ischemia, improved functional recovery from I-R, and a substantial reduction in LDH release. On the other hand, sildenafil did not exert any significant effect on coronary flow. In contrast, in a separate set of perfusions, administration of sildenafil to control C57BL/10<sup>ScSn</sup> mice had no significant effect on the recovery of RPP,  $\pm$ dp/dt and release of LDH (Figure 1, supplementary material).

As expected, I-R caused opening of the PTP in perfused hearts from both animal strains, but this effect was more than 2-fold greater in hearts from *mdx* mice



compared to their normal counterparts (Figure 1F). This was accompanied by greater release of pro-apoptotic factors in the cytosolic fraction of *mdx* hearts and enhanced activity of caspase 9 and caspase 3 (Figure 2). Importantly, administration of sildenafil to *mdx* mice prevented PTP opening and activation of these downstream cell death signals. In contrast, administration of sildenafil to control mice had no effect on PTP opening in our experimental conditions (Figure 1F, supplementary material).

**Sildenafil attenuates excessive tissue calcium overload and mitochondrial oxidative stress in the perfused dystrophic heart following I-R:**

We next investigated factors that could participate to enhanced I-R-induced PTP opening in dystrophic hearts, and determined whether they were beneficially affected by the administration of sildenafil. As shown in Figure 3, total tissue  $\text{Ca}^{2+}$  content, a key factor known to promote PTP opening [58], was greater in dystrophic hearts compared to their normal counterparts. Importantly, administration of sildenafil to *mdx* mice reduced tissue  $\text{Ca}^{2+}$  to the levels observed in normal hearts.

Oxidative stress is, together with tissue  $\text{Ca}^{2+}$  content, another major factor that promotes PTP opening [58]. For this reason, aconitase activity, a specific marker of mitochondrial oxidative stress particularly in tissues with a high mitochondrial content, was measured. As shown in Figure 3, tissue aconitase activity, was significantly reduced following I-R in dystrophic hearts relative to controls, suggesting the presence of greater oxidative stress. In contrast, the activity of citrate synthase, which is not sensitive to inactivation by oxidative stress, was similar in the two animal strains ( $15.4 \pm 2.5$ ,  $15.5 \pm 1.7$  and  $15.8 \pm 2.3$  mU/min/g ventricular wet

weight, in control and *mdx*, and *mdx*+Sil, n=6 per group). Importantly, administration of sildenafil to *mdx* mice partially prevented the loss of aconitase activity without affecting the activity of citrate synthase,

**Primary mitochondrial abnormalities prior to I-R as a predisposing factor for PTP opening:**

In separate experiments, permeabilized cardiac fiber bundles were prepared from freshly isolated heart, which had not been perfused or subjected to I-R in order to determine whether mitochondrial functional abnormalities, either at the level of respiration, ROS production and scavenging, or sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening, could have predisposed to I-R-induced dysfunction in the dystrophic heart at this early stage of disease. As shown in Figure 4, no differences in respiration were observed between mitochondria from control and *mdx* hearts in any of the respiratory states, regardless of the type of substrate used. Similarly, the net rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  release measured under various respiratory states, and the mitochondrial  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenging capacity, were similar in the two animal strains. On the other hand, in response to a  $\text{Ca}^{2+}$  challenge,  $\text{Ca}^{2+}$  uptake velocity was significantly greater (62% increase vs. controls,  $p < 0.01$ ), and PTP opening following addition of  $\text{Ca}^{2+}$  occurred more rapidly ( $946 \pm 20$  sec vs.  $1075 \pm 23$  sec,  $p < 0.01$ ), in mitochondria from *mdx* hearts than in their control counterparts (Figure 5). Considering that accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  in mitochondria is a key factor promoting PTP opening under stress, these experiments were repeated in fiber bundles prepared from *mdx* mice previously treated with sildenafil to determine whether sildenafil could correct excessive mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. As shown in Figure 5, sildenafil treatment reduced the velocity of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, and time to PTP opening was increased such that it was no longer different

from the values observed in normal controls. However, addition of sildenafil directly to permeabilized fiber bundles *in vitro* was without effect (results not shown).

## DISCUSSION

Previous studies have suggested that in *mdx* mice, the abnormally high susceptibility of the heart to stress-induced injury plays a role in the development of cardiomyopathy [13,29]. Here, we demonstrate using an experimental model of *ex vivo* perfused hearts subjected to an acute I-R stress, that already at a young age, hearts from *mdx* mice display an increased susceptibility to opening of the PTP, enhanced activation of cell death signaling, and mitochondrial oxidative stress, all of which contribute to cardiomyocyte damage and poorer functional recovery following acute stress compared to normal control hearts. Importantly, this was observed in hearts isolated from young *mdx* mice prior to clinical signs of cardiomyopathy *in vivo*, suggesting that stress-induced mitochondrial PTP opening could be an early contributor to disease progression. Furthermore, additional data provide some new insights into the mechanisms that might predispose mitochondria from 12-week-old *mdx* heart to increased PTP opening following a stress challenge. In fact, we found that *in vitro*  $\text{Ca}^{2+}$  uptake velocity is increased in mitochondria from non-ischemic *mdx* hearts. However, mitochondria from these hearts displayed no respiratory defects or alterations in mitochondrial ROS emitting potential. Finally, an important and previously unreported finding of the present study is that administration of sildenafil to *mdx* mice prior to subjecting *ex vivo* perfused hearts to the I-R stress protocol largely prevents excessive opening of the PTP, and its downstream consequences, reduces tissue  $\text{Ca}^{2+}$  levels, and inhibits mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake.

### **Vulnerability to stress-induced PTP opening: An early contributor in the pathogenesis of cardiomyopathy in DMD.**

Transient focal ischemia is believed to contribute to skeletal muscle damage in DMD[36]. However, in the heart the existence of this phenomenon remains debated [19], and mechanical stress is considered the main factor promoting cardiomyocyte injury [13,29]. In the present study, the primary reason for using I-R in conjunction with adrenergic stress was not to mimic a physiopathological mechanism *per se*, but rather to create sufficient stress to unmask in the whole organ, the vulnerability of dystrophin-deficient cardiomyocytes to PTP opening at an early stage of the disease. This experimental protocol was chosen following pilot experiments in which we were unable to detect significant differences in PTP opening between the control and the *mdx* group when hearts were submitted to 5 min of adrenergic stress without the subsequent period of I-R ( $[^3\text{H}]\text{-DOG}$  index:  $3.58 \pm 0.69$  and  $3.21 \pm 0.41$  in *mdx* and control respectively,  $P = 0.93$ ,  $n = 11$ ). However, we believe that this should not be taken as a proof that mechanical stress alone is unable to induce PTP opening. Indeed, in a recent study Jung et al. [27] showed that following mechanical stress *in vitro* in isolated dystrophin-deficient cardiomyocytes, a subset of mitochondria accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  and depolarize abruptly shortly after, which is typical of PTP opening. The number of mitochondria in which this was reported was, however, relatively small, which may explain why in our study using whole hearts, I-R was required to produce measurable differences in mitochondrial  $[^3\text{H}]\text{-DOG}$  entrapment between the control and the *mdx* group. Nevertheless, when repeated chronically over the slow and progressive course of the disease, restricted opening of the PTP during mechanical stress is likely to contribute to activation of cell death signaling. Furthermore, as we [33], and others [25,26] have previously shown, increased opening of the PTP measured in the intact organ is invariably

accompanied by an impairment of respiratory function in mitochondria isolated post-stress. Therefore, repeated opening of the PTP could also contribute to jeopardize energy homeostasis of the *mdx* heart. Taken together, our data thus suggest that in DMD, enhanced opening of the PTP intervenes early in the disease, and promotes the development of overt cardiomyopathy. Previous results by Millay et al. [37], showing that genetic ablation of the PTP sensitizing protein CypD in other models of MD (*i.e.* *scgd*<sup>-/-</sup> and *lama*<sup>-/-</sup> mice) ameliorates end-points of cardiomyopathy (*i.e.* fibrosis, hemodynamic, and survival) further supports this possibility.

### **Role of cellular and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> handling.**

An important factor that likely explains excessive opening of the PTP in hearts from *mdx* mice compared to those of control mice is likely the increase in tissue Ca<sup>2+</sup> levels observed following I-R (Figure 3). Indeed, although we could not measure mitochondrial Ca<sup>2+</sup> levels using our assay, it is well established that enhanced tissue Ca<sup>2+</sup> levels result in mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload and PTP opening [12,20,58]. The increase in tissue Ca<sup>2+</sup> levels observed following I-R in hearts from *mdx* mice also concurs with results from previous studies showing that following mechanical stress, Ca<sup>2+</sup> entry is increased in dystrophin-deficient myocytes through various mechanisms that ultimately contribute to dysfunction and injury, including transient microrupture of the sarcolemmal membrane, activation of voltage-independent stretch-sensitive Ca<sup>2+</sup>-leak channels (SACs) [17,57], store-operated Ca<sup>2+</sup> channels (SOCs) [23,44,51], and ryanodine receptors [4,27], as well as reversal of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers [15].

In contrast to these sarcolemmal and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling mechanisms, which have been extensively investigated, to our knowledge no data is

available on mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  handling in dystrophin-deficient myocytes. In the present study, we found that mitochondria in permeabilized fibers isolated from non-perfused *mdx* hearts displayed a greater rate of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, resulting in premature opening of the PTP, when exposed to a standardized  $\text{Ca}^{2+}$  challenge *in vitro* (Figure 5). These novel results thus suggest that in addition to increased cellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry, enhanced mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake kinetics *per se* could exacerbate mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload, and thus promote PTP opening when the dystrophin-deficient heart is challenged. More detailed studies will however be required to determine whether this is caused by changes in the driving force for  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, the kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  transport across the outer and inner membranes, or differences in the access to bulk-phase  $\text{Ca}^{2+}$  due to changes in the mitochondrial morphology [48].

### **Mitochondrial oxidative stress.**

Several lines of evidence, including the reduction in myocardial aconitase activity reported in the present (Figure 3) and previous studies [28], as well as direct measurement of mitochondrial superoxide production in isolated skeletal muscle fibers following mechanical stress [46], suggest that dystrophin deficiency is associated with mitochondrial oxidative stress in myocytes. However, because ROS dynamics in isolated mitochondria have never been investigated in hearts from *mdx* mice, it is unclear from these studies whether oxidative stress is caused by intrinsic changes in ROS handling within mitochondria, or by stress-induced alteration of cellular factors that regulate mitochondrial ROS production in intact cells. In the present study, data obtained *in vitro* in permeabilized fibers isolated from non-perfused hearts revealed that under an unstressed state there are no differences in the net rates of  $\text{H}_2\text{O}_2$  release between mitochondria from control and *mdx* hearts under conditions in which superoxide production was maximized (*i.e.* in state 2 respiration

in presence of glutamate + succinate, and after inhibition of complex III with antimycin-A), or in the presence of ADP, a more physiologically relevant condition. Moreover the rate of scavenging of exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which provides a global measure of antioxidant flux capacity in respiring mitochondria, did not differ between the control and *mdx* group (Figure 4). Overall, these data thus indicate that, at least prior to detectable cardiomyopathy, mitochondrial oxidative stress observed following I-R in the *ex vivo* perfused heart of dystrophin-deficient *mdx* mice (Figure 3 and [28]) is attributable to changes in factors regulating ROS production in cardiomyocytes, but not to an increase in ROS emitting potential of the respiratory chain, or to a reduction in mitochondrial anti-oxidant defense systems. In this regard, factors such as enhanced cellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels, and opening of the PTP, which both stimulate mitochondrial ROS production [3,8,54], are likely to play important roles. Our findings that sildenafil reduced tissue  $\text{Ca}^{2+}$  levels and completely abolished excessive opening of the PTP, as well as partially restoring aconitase activity, in *mdx* hearts are consistent with this notion.

### **Respiratory function.**

Our studies performed in permeabilized fibers from non-perfused hearts showed that respiratory function was similar in control and *mdx* mice (Figure 4). These results are consistent with previously published data by Kuznetsov et al. [31] showing that prior to cardiomyopathy, (*i.e.* in 16-24 weeks old *mdx* mice), mitochondrial respiratory function is normal in the heart when measured under unstressed conditions. Interestingly in the latter study, skeletal muscles, which already present a severe pathological phenotype at this age, displayed overt mitochondrial respiratory defects, suggesting that respiratory dysfunctions are detectable only when myopathy is well established. Our data thus indicate that prior

to cardiomyopathy an experimental stress is required to unmask abnormal mitochondrial responses in *mdx* hearts, as observed in other models of acquired cardiomyopathy [9].

**Protective effect of sildenafil and the role of defective cGMP signaling in cardiomyopathy.**

Previous studies have established that lack of dystrophin causes a mislocalization, and a pronounced reduction of nNOS activity in skeletal muscle and heart [5,22,55], which leads to a deficit in NO-mediated cGMP signaling. Recently, we showed for the first time that *in vivo* treatment with sildenafil for 6 weeks (0.7 mg/kg/day i.p.) to enhance cGMP signaling protected hearts of young *mdx* mice against stress-induced cell death [29]. However, the underlying factors involved in this effect were not investigated. In the present study, we demonstrate using our *ex-vivo* model of I-R stress that, at least acutely, sildenafil largely abolishes excessive PTP opening and activation of downstream cell death signaling, suggesting that prevention of mitochondrial dysfunction directly and/or indirectly is an important cardioprotective mechanism against stress-induced damage. Importantly, under our experimental conditions, sildenafil had no effect in hearts from normal mice (Figure 1 supplementary material). This novel observation thus provide evidence that the deficit in cGMP signaling inherent to lack of dystrophin [5,22,55] is a contributor to mitochondrial dysfunction and tissue injury when the heart is acutely challenged by stress.

Of note, *mdx* hearts displayed an attenuated response to norepinephrine before ischemia and sildenafil restored this response to the level observed in hearts from control animals, suggesting that alteration in beta-adrenergic responsiveness



could be involved for the protective effect of sildenafil. However, previous studies in *mdx* mice have shown that beta-adrenergic responsiveness is normal at 12 weeks of age and deteriorates only in older mice (12 months) [32]. Furthermore, at least in normal hearts, sildenafil decreases adrenergic responsiveness [6,50], which contrasts with our observations. Therefore, it is unlikely that altered beta-adrenergic responsiveness can explain the effects of norepinephrine/ischemia and of sildenafil observed in *mdx* hearts. Considering our data, a more likely explanation is that sildenafil attenuates cardiomyocyte damage, which in turn improves myocardial function.

The striking efficacy of sildenafil at preventing PTP opening in *mdx* hearts following I-R may be related to the fact that cGMP signaling can simultaneously act on several crucial determinants of PTP opening. In fact, our results show that sildenafil reduced tissue  $\text{Ca}^{2+}$  in reperfused *mdx* hearts to the level observed in normal hearts. Since there is a well-established relationship between cellular and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  levels during I-R [12,20], these data strongly suggest that attenuation of  $\text{Ca}^{2+}$  overload, plays an important role in limiting permeability transition. Our novel findings concur with the known ability of cGMP-dependent protein kinase 1 (PKG1) to reduce intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  through inhibition of various sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  channels [38,45], in particular TRPC1 channels, which are believed to be stretch/store-activated [10]. In fact, these channels can be modulated by cGMP/PKG [10], and their expression and activity are increased in dystrophin-deficient myocytes [52], thus contributing importantly to enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  entry [15,52].

In addition to preventing excessive cellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry, our results indicate that administration of sildenafil *in vivo* also induced an inhibition of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake velocity, and a delay in time to PTP opening that could still be detected *ex vivo* in permeabilized cardiac fibers several hours after. In contrast, direct addition of sildenafil to permeabilized fiber bundles *in vitro* was without effect, which is in line with recent observations in isolated mitochondria [16]. These results thus suggest that sildenafil inhibits mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake through activation of a cellular signaling cascade that cannot be activated after myocytes have been permeabilized. In isolated mitochondria recombinant PKG was shown to inhibit PTP opening through a complex mechanism suggested to involve activation of intra-mitochondrial protein kinase C epsilon (PKC $\epsilon$ ) and subsequent opening mK<sub>ATP</sub> channels [7,18]. However, this is unlikely to explain the effect of sildenafil in the present study since our experiments were performed in a  $\text{K}^+$ -free media. On the other hand, recent evidence show that mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is regulated through phosphorylation of the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake machinery by several kinases, including p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), as well as PKCs  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\zeta$  [30,49]. Further work is required to determine whether sildenafil can modify the phosphorylation state of mitochondrial proteins that can affect  $\text{Ca}^{2+}$  uptake.

### **Conclusion.**

In conclusion, our results demonstrate that opening of the PTP is an important factor contributing to the high susceptibility of dystrophin-deficient cardiomyocytes to stress-induced injury, which is considered to play a key role in the development of cardiomyopathy in DMD. From a clinical perspective, recent studies performed in skeletal muscle have suggested that treatment with specific PTP inhibitors that bind cyclophilin-D (i.e. Debio025) may be a promising avenue for limiting disease

progression in DMD [37]. Our results demonstrate that at least in the heart, sildenafil could constitute an advantageous adjunct to cyclophilin-D ligands to potently inhibit PTP opening. Although preliminary evidences indicate that long-term administration of sildenafil ameliorates cardiopathy in older *mdx* mice [40], further studies are required to delineate the role of mitochondrial protection in this effect. Ultimately, sildenafil could be rapidly transferred in a clinical setting since it is already administered to children for the treatment of pulmonary hypertension and is reported to be safe and well-tolerated [24].

#### **AUTHORS CONTRIBUTION**

All experiments were performed in the Laboratory of YB at the Université de Montréal. Conception and design of experiments was performed by YB, CDR, and MK. Experiments and data analysis was performed by AA, FD, CBL and RG. All authors contributed to data interpretation. The manuscript was written by YB, CDR and MK with critical inputs by BJP and BGA.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was funded by a Pfizer Cardiovascular Research Award grant to YB. YB is a Junior II Investigator of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We are grateful to Roselle Gélinas for her expert advices on mouse heart perfusion, and to Christian F. Deschepper for thoughtful discussions. MK's present address is: Lebanese American University, School of Pharmacy and School of Medicine, Byblos, Lebanon.

## REFERENCES

1. Anderson EJ, and Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *American journal of physiology* 290: C844-851, 2006.
2. Angelin A, Tiepolo T, Sabatelli P, Grumati P, Bergamin N, Golfieri C, Mattioli E, Gualandi F, Ferlini A, Merlini L, Maraldi NM, Bonaldo P, and Bernardi P. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 991-996, 2007.
3. Batandier C, Leverve X, and Fontaine E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279: 17197-17204, 2004.
4. Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, Mongillo M, Liu X, Rothman L, Matecki S, Lacampagne A, and Marks AR. Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 15: 325-330, 2009.
5. Bia BL, Cassidy PJ, Young ME, Rafael JA, Leighton B, Davies KE, Radda GK, and Clarke K. Decreased myocardial nNOS, increased iNOS and abnormal ECGs in mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Cell Cardiol* 31: 1857-1862, 1999.
6. Borlaug BA, Melenovsky V, Marhin T, Fitzgerald P, and Kass DA. Sildenafil inhibits beta-adrenergic-stimulated cardiac contractility in humans. *Circulation* 112: 2642-2649, 2005.
7. Borutaite V, Morkuniene R, Arandarcikaite O, Jekabsone A, Barauskaite J, and Brown GC. Nitric oxide protects the heart from ischemia-induced apoptosis and mitochondrial damage via protein kinase G mediated blockage of permeability transition and cytochrome c release. *J Biomed Sci* 16: 70, 2009.
8. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, and Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology* 287: C817-833, 2004.
9. Burelle Y, Khairallah M, Ascah A, Allen BG, Deschepper CF, Petrof BJ, and Des Rosiers C. Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart. *J Mol Cell Cardiol* 48: 310-321, 2010.
10. Chen J, Crossland RF, Noorani MM, and Marrelli SP. Inhibition of TRPC1/TRPC3 by PKG contributes to NO-mediated vasorelaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H417-424, 2009.
11. Ciminelli M, Ascah A, Bourduas K, and Burelle Y. Short Term Training Attenuates Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Without Affecting Myocardial Function Following Ischemia-Reperfusion. *Mol Cell Biochem* 2006.
12. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 ( Pt 2): 233-249, 1999.
13. Danialou G, Comtois AS, Dudley R, Karpati G, Vincent G, Des Rosiers C, and Petrof BJ. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. *FASEB J* 15: 1655-1657, 2001.
14. de Kermadec JM, Becane HM, Chenard A, Tertrain F, and Weiss Y. Prevalence of left ventricular systolic dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: an echocardiographic study. *Am Heart J* 127: 618-623, 1994.

15. Fanchaouy M, Polakova E, Jung C, Ogrodnik J, Shirokova N, and Niggli E. Pathways of abnormal stress-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx into dystrophic *mdx* cardiomyocytes. *Cell Calcium* 46: 114-121, 2009.
16. Fernandes MA, Marques RJ, Vicente JA, Santos MS, Monteiro P, Moreno AJ, and Custodio JB. Sildenafil citrate concentrations not affecting oxidative phosphorylation depress  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation by rat heart mitochondria. *Mol Cell Biochem* 309: 77-85, 2008.
17. Gailly P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1600: 38-44, 2002.
18. Garlid KD, Costa AD, Quinlan CL, Pierre SV, and Dos Santos P. Cardioprotective signaling to mitochondria. *J Mol Cell Cardiol* 46: 858-866, 2009.
19. Gneocchi-Ruscione T, Taylor J, Mercuri E, Paternostro G, Pogue R, Bushby K, Sewry C, Muntoni F, and Camici PG. Cardiomyopathy in duchenne, becker, and sarcoglycanopathies: a role for coronary dysfunction? *Muscle Nerve* 22: 1549-1556, 1999.
20. Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS, Rutter GA, Hansford RG, Stern MD, and Silverman HS. Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 39: 423-433, 1998.
21. Hentze H, Schwoebel F, Lund S, Keel M, Ertel W, Wendel A, Jaattela M, and Leist M. *In vivo* and *in vitro* evidence for extracellular caspase activity released from apoptotic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 1111-1117, 2001.
22. Heydemann A, Huber JM, Kakkar R, Wheeler MT, and McNally EM. Functional nitric oxide synthase mislocalization in cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 36: 213-223, 2004.
23. Huang J, van Breemen C, Kuo KH, Hove-Madsen L, and Tibbits GF. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry modulates sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  loading in neonatal rabbit cardiac ventricular myocytes. *American journal of physiology* 290: C1572-1582, 2006.
24. Huddleston AJ, Knoderer CA, Morris JL, and Ebenroth ES. Sildenafil for the treatment of pulmonary hypertension in pediatric patients. *Pediatr Cardiol* 30: 871-882, 2009.
25. Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L, and Karmazyn M. NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 38: 135-143, 2005.
26. Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, and Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* 549: 513-524, 2003.
27. Jung C, Martins AS, Niggli E, and Shirokova N. Dystrophic cardiomyopathy: amplification of cellular damage by  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and reactive oxygen species-generating pathways. *Cardiovasc Res* 77: 766-773, 2008.
28. Khairallah M, Khairallah R, Young ME, Dyck JR, Petrof BJ, and Des Rosiers C. Metabolic and signaling alterations in dystrophin-deficient hearts precede overt cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 43: 119-129, 2007.
29. Khairallah M, Khairallah RJ, Young ME, Allen BG, Gillis MA, Danialou G, Deschepper CF, Petrof BJ, and Des Rosiers C. Sildenafil and cardiomyocyte-specific cGMP signaling prevent cardiomyopathic changes associated with dystrophin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7028-7033, 2008.
30. Koncz P, Szanda G, Fulop L, Rajki A, and Spat A. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is inhibited by a concerted action of p38 MAPK and protein kinase D. *Cell Calcium* 46: 122-129, 2009.

31. Kuznetsov AV, Winkler K, Wiedemann FR, von Bossanyi P, Dietzmann K, and Kunz WS. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient *mdx* mouse. *Mol Cell Biochem* 183: 87-96, 1998.
32. Lu S, and Hoey A. Age- and sex-associated changes in cardiac beta(1)-adrenoceptors from the muscular dystrophy (*mdx*) mouse. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1661-1668, 2000.
33. Marcil M, Ascah A, Matas J, Belanger S, Deschepper CF, and Burelle Y. Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress. *J Mol Cell Cardiol* 41: 998-1009, 2006.
34. Matas J, Young NT, Bourcier-Lucas C, Ascah A, Marcil M, Deschepper CF, and Burelle Y. Increased expression and intramitochondrial translocation of cyclophilin-D associates with increased vulnerability of the permeability transition pore to stress-induced opening during compensated ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 46: 420-430, 2009.
35. McNally EM. New approaches in the therapy of cardiomyopathy in muscular dystrophy. *Annu Rev Med* 58: 75-88, 2007.
36. Mendell JR, Engel WK, and Derrer EC. Duchenne muscular dystrophy: functional ischemia reproduces its characteristic lesions. *Science* 172: 1143-1145, 1971.
37. Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, Sweeney HL, Robbins J, and Molkentin JD. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med* 14: 442-447, 2008.
38. Nagayama T, Hsu S, Zhang M, Koitabashi N, Bedja D, Gabrielson KL, Takimoto E, and Kass DA. Sildenafil stops progressive chamber, cellular, and molecular remodeling and improves calcium handling and function in hearts with pre-existing advanced hypertrophy caused by pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 53: 207-215, 2009.
39. Nigro G, Comi LI, Politano L, and Bain RJ. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol* 26: 271-277, 1990.
40. Parchen MC, Percival JM, Dao-Fu D, Gray HN, Frohner SC, and Beavo JA. Sildenafil Ameliorates Cardiomyopathy in *mdx* Mice. *FASEB Journal* 23: 2009.
41. Picard M, Csukly K, Robillard ME, Godin R, Ascah A, Bourcier-Lucas C, and Burelle Y. Resistance to Ca<sup>2+</sup>-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R659-668, 2008.
42. Quinlan JG, Hahn HS, Wong BL, Lorenz JN, Wenisch AS, and Levin LS. Evolution of the *mdx* mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul Disord* 14: 491-496, 2004.
43. Reutenauer J, Dorchies OM, Patthey-Vuadens O, Vuagniaux G, and Ruegg UT. Investigation of Debio 025, a cyclophilin inhibitor, in the dystrophic *mdx* mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *British journal of pharmacology* 2008.
44. Robert V, Massimino ML, Tosello V, Marsault R, Cantini M, Sorrentino V, and Pozzan T. Alteration in calcium handling at the subcellular level in *mdx* myotubes. *J Biol Chem* 276: 4647-4651, 2001.
45. Schlossmann J, Feil R, and Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med* 35: 21-27, 2003.
46. Shkryl VM, Martins AS, Ullrich ND, Nowycky MC, Niggli E, and Shirokova N. Reciprocal amplification of ROS and Ca(2+) signals in stressed *mdx* dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch* 458: 915-928, 2009.

47. Siu PM, and Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. *J Physiol* 565: 309-323, 2005.
48. Spat A, Szanda G, Csordas G, and Hajnoczky G. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling. *Cell Calcium* 44: 51-63, 2008.
49. Szanda G, Koncz P, Rajki A, and Spat A. Participation of p38 MAPK and a novel-type protein kinase C in the control of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. *Cell Calcium* 43: 250-259, 2008.
50. Takimoto E, Champion HC, Belardi D, Moslehi J, Mongillo M, Mergia E, Montrose DC, Isoda T, Aufiero K, Zaccolo M, Dostmann WR, Smith CJ, and Kass DA. cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism. *Circ Res* 96: 100-109, 2005.
51. Vandebrouck A, Ducret T, Basset O, Sebillé S, Raymond G, Ruegg U, Gailly P, Cognard C, and Constantin B. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. *FASEB J* 20: 136-138, 2006.
52. Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M, Debaix H, and Gailly P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (*mdx*) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 158: 1089-1096, 2002.
53. Wallace GQ, and McNally EM. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* 71: 37-57, 2009.
54. Wang W, Fang H, Groom L, Cheng A, Zhang W, Liu J, Wang X, Li K, Han P, Zheng M, Yin J, Wang W, Mattson MP, Kao JP, Lakatta EG, Sheu SS, Ouyang K, Chen J, Dirksen RT, and Cheng H. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 134: 279-290, 2008.
55. Wehling-Henricks M, Jordan MC, Roos KP, Deng B, and Tidball JG. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium. *Hum Mol Genet* 14: 1921-1933, 2005.
56. Wilding JR, Schneider JE, Sang AE, Davies KE, Neubauer S, and Clarke K. Dystrophin- and MLP-deficient mouse hearts: marked differences in morphology and function, but similar accumulation of cytoskeletal proteins. *FASEB J* 19: 79-81, 2005.
57. Williams IA, and Allen DG. Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from *mdx* mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H846-855, 2007.
58. Zoratti M, and Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176, 1995.

## LEGEND

**Figure 1: Response to ischemia-reperfusion in control and *mdx* hearts.** Rate pressure product (RPP: panel A), maximal and minimal rate of pressure development ( $dp/dt_{\max}$  and  $dp/dt_{\min}$ , panel B, C), coronary flow (panel D), release of LDH in the coronary effluent (panel E) and DOG index (Panel F) in control and *mdx* hearts submitted to low flow ischemia in presence of adrenergic stress. Following the initial 10-min period of stabilization, hearts were perfused with KH buffer containing [ $^3$ H]DOG as indicated. Perfusion was switched back to normal KH buffer for 5 min prior to ischemia in order to wash out extra-cellular [ $^3$ H]DOG. During washout, the infusion of norepinephrine (100  $\mu$ M) was started and maintained during I-R. [ $^3$ H]-DOG index, reflecting the extent of PTP opening in the heart, is expressed in ratio units in control, *mdx* and *mdx*+Sil ( $n = 10$ -12 hearts per group). a: significantly different from control ( $P < 0.05$ ), b: significantly different from *mdx* treated with vehicle ( $P < 0.05$ ).

**Figure 2: Mitochondrial cell death signaling in control and *mdx* hearts following ischemia-reperfusion.** Panel A and B: Amount of AIF, Smac/DIABLO and cytochrome c released in the crude cytosolic fraction from control, *mdx* and *mdx*+sil following I-R ( $n = 5$ -7 hearts per group). AIF, Smac/DIABLO and cytochrome c contents were normalized against the cytosolic marker enzyme LDH, which was similar in the control and *mdx* group. Panel C and D: activity of caspase 9 and 3. Results are expressed in fluorescence units per mU of LDH released in the coronary effluent to take into account that caspases are released along with LDH from cells that lose their membrane integrity [21]. a: significantly different from control ( $P < 0.01$ ), b: significantly different from *mdx* treated with vehicle ( $P < 0.01$ ).



**Figure 3: Calcium content and aconitase activity in control and *mdx* hearts following I-R.** Panel A: Total  $\text{Ca}^{2+}$  content in whole heart homogenates following I-R ( $n=5-7$  hearts per group). Panel B: Activity of the mitochondrial enzyme aconitase in whole heart homogenates following I-R ( $n=5-7$  hearts per group). a: significantly different from control ( $P<0.05$ ).

**Figure 4: Mitochondrial respiration and ROS dynamics in control and *mdx* hearts.** Panel A: respiration rates measured in cardiac fibers prepared from hearts freshly isolated from control and *mdx* mice. Following addition of fibers, the following addition sequence was performed: glutamate (5 mM), ADP (1 mM), rotenone (1  $\mu\text{M}$ : not shown), succinate (5 mM), CCCP (1  $\mu\text{M}$ ), antimycin-A (8  $\mu\text{M}$ : not shown), TMPD-ascorbate (0.9:9.0 mM) and KCN (0.6 mM). Panel B: Net rate of mitochondrial  $\text{H}_2\text{O}_2$  release in fibers from control and *mdx* hearts. The substrates and inhibitors were added sequentially at the above-mentioned concentrations. Panel C: Rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenging by mitochondria with pyruvate and malate (50 and 20  $\mu\text{M}$ ) following addition of 20 nmoles  $\text{H}_2\text{O}_2$ . All experiments were performed in parallel in one control and one *mdx* heart on each day ( $n=8-12$  heart per group). a: significantly different from control ( $P<0.05$ ).

**Figure 5: *in vitro* mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  handling in permeabilized fibers from non-perfused hearts.** Panel A: Representative calcium-green 5N traces showing mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and release in permeabilized fibers prepared from freshly isolated non-ischemic hearts from control, *mdx* and *mdx* + sildenafil mice. The linear slope representing the initial rate of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is shown for each trace. Panel B: Initial rate of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake measured following injection 20 nmoles

$\text{Ca}^{2+}$ . Panel C: Time required for opening of the PTP. Experiments were performed in parallel of other mitochondrial functional assays described in figure 4 ( $n=8-12$  heart per group). a: significantly different from control ( $P<0.01$ ), b: significantly different from *mdx* treated with vehicle ( $P<0.05$ ).

**Figure 1 supplementary material: Effect of sildenafil on functional response to ischemia-reperfusion in control hearts.** Evolution of rate pressure product (RPP: panel A), maximal and minimal rate of pressure development ( $\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$  and  $\text{dp}/\text{dt}_{\text{min}}$ , panel B, C), coronary flow (panel D) release of LDH in the coronary effluent (panel E) and extent of PTP opening (panel F) in control hearts submitted to low flow ischemia in presence of adrenergic stress. Animals were injected with either saline or sildenafil (0.7 mg/kg i.p.) 30 min prior to sacrifice ( $n= 9$  animals per group).

Figure 1

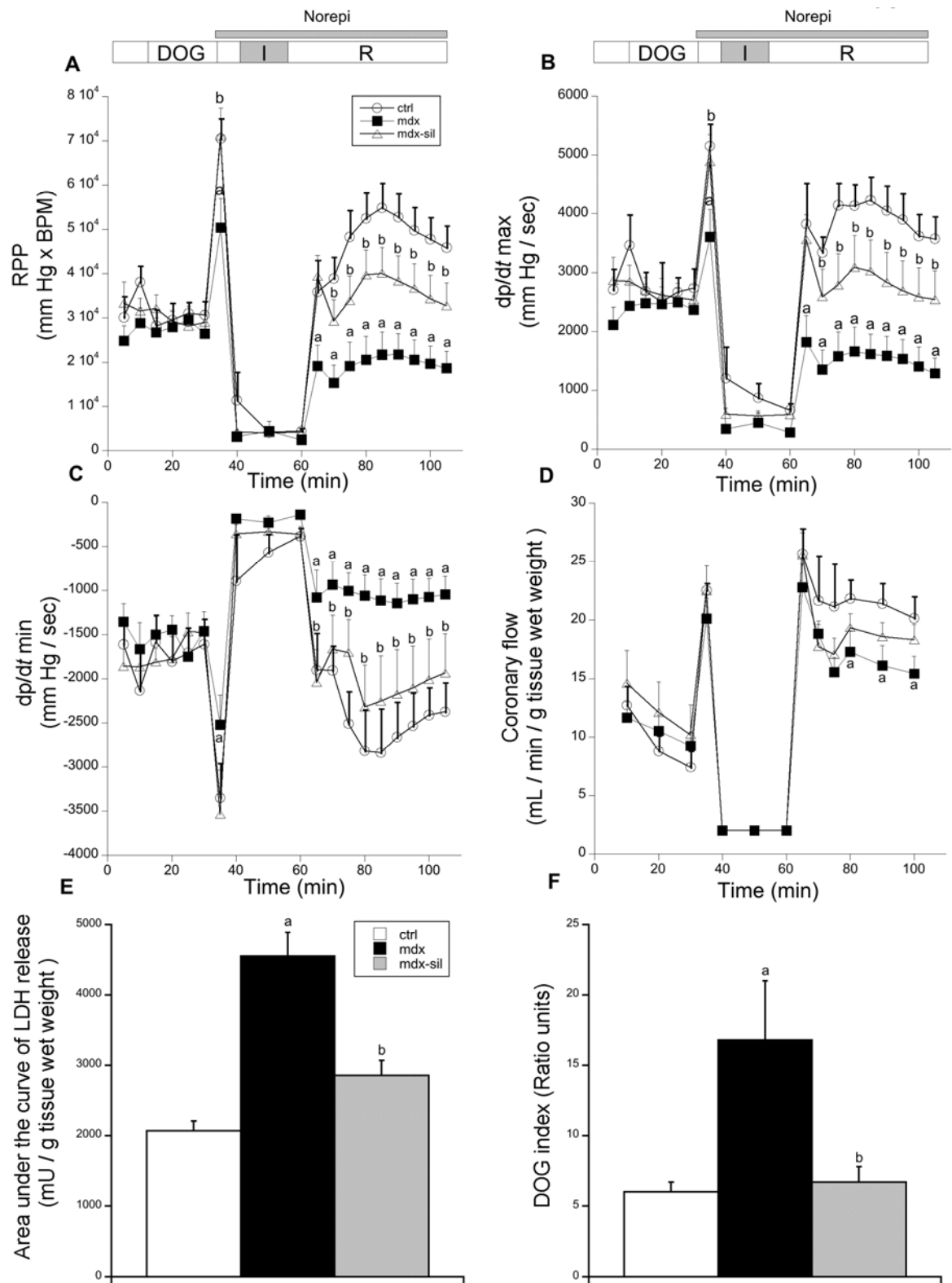


Figure 2

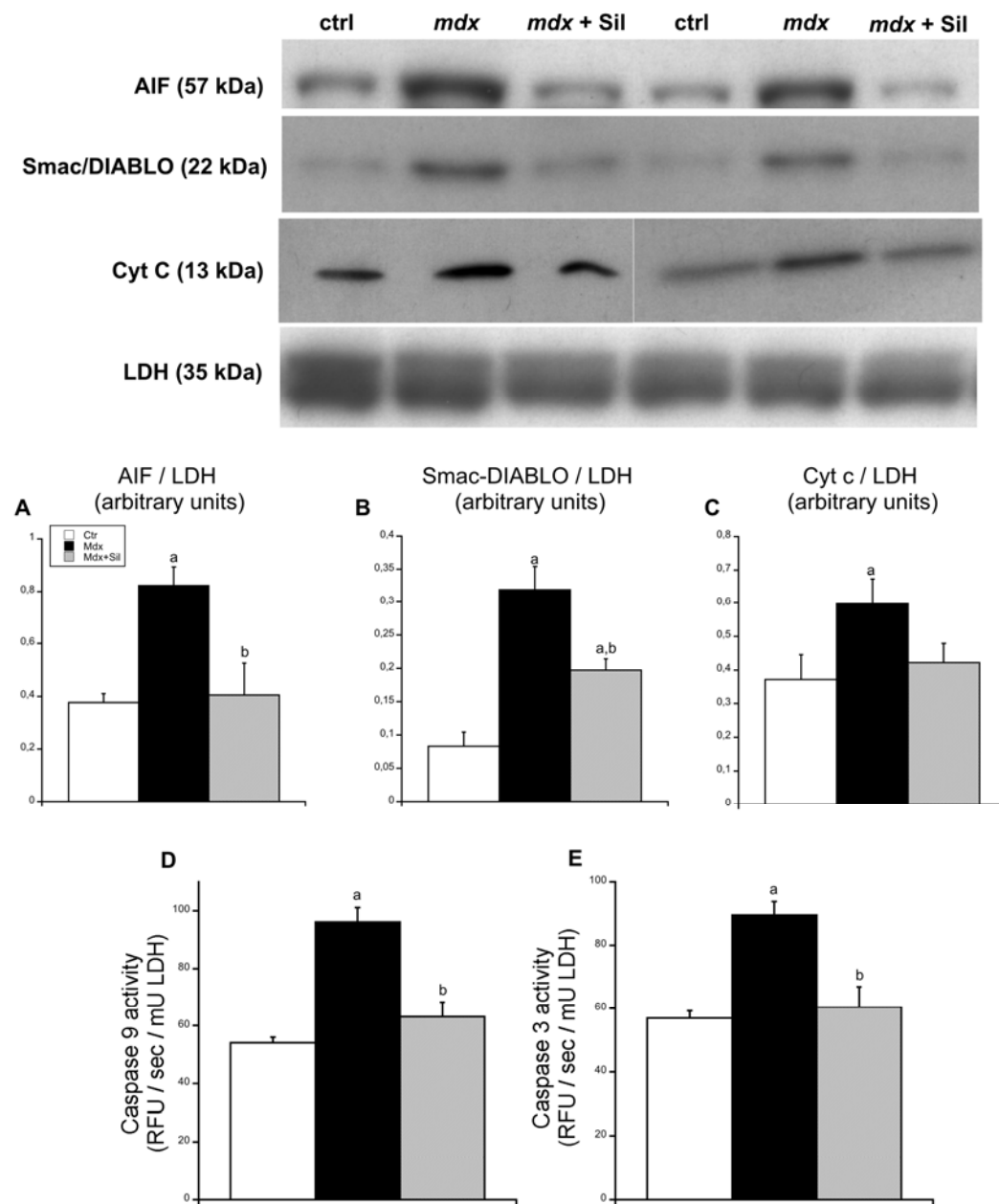
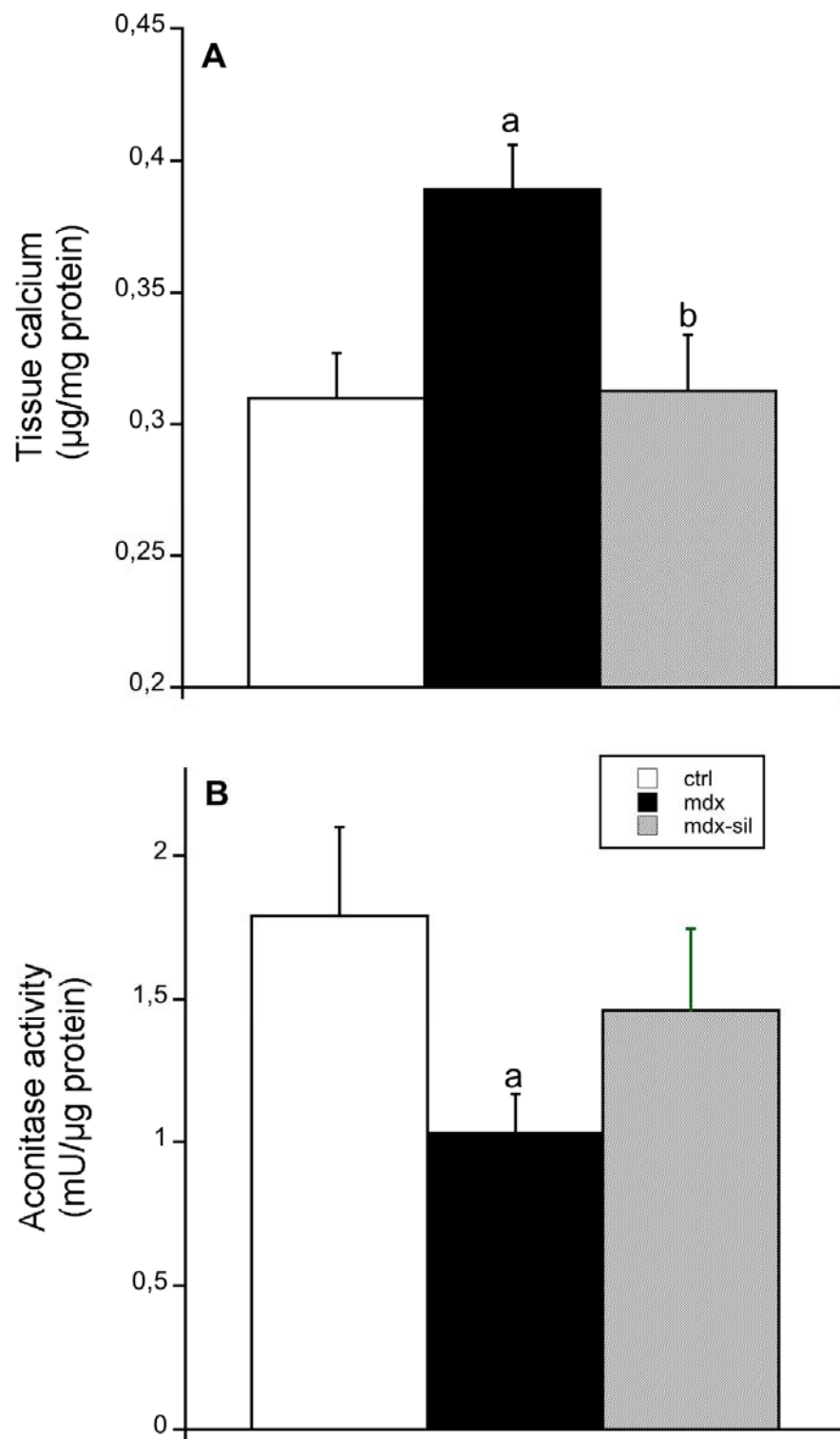


Figure 3



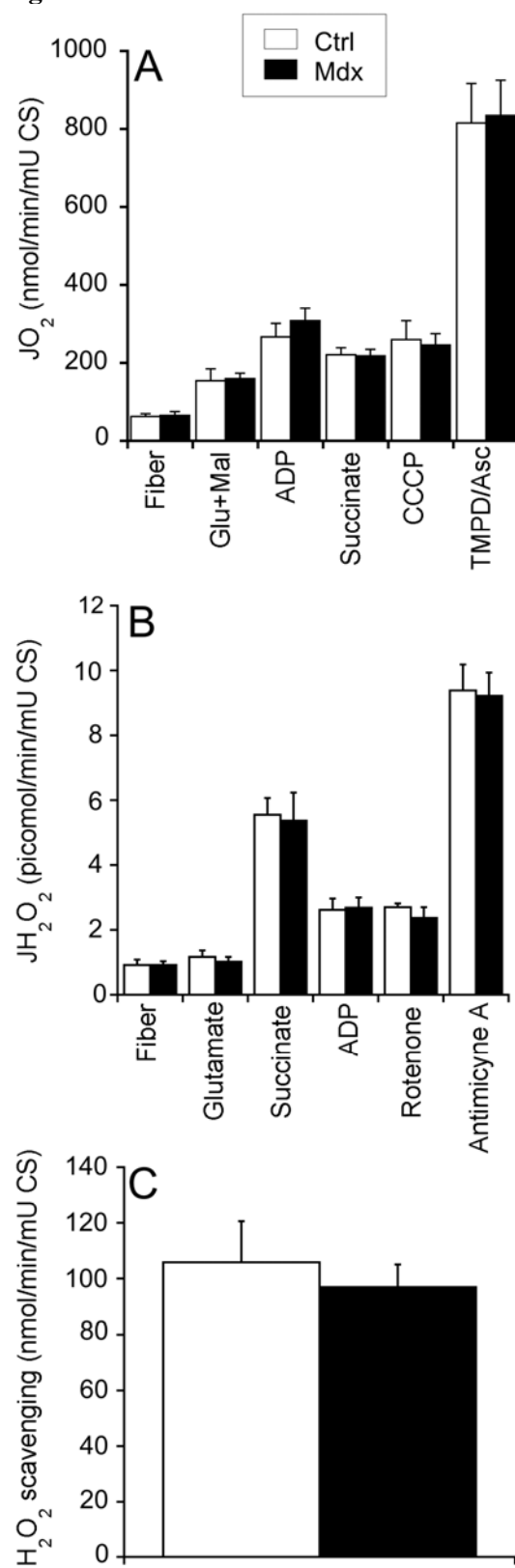
**Figure 4**

Figure 5

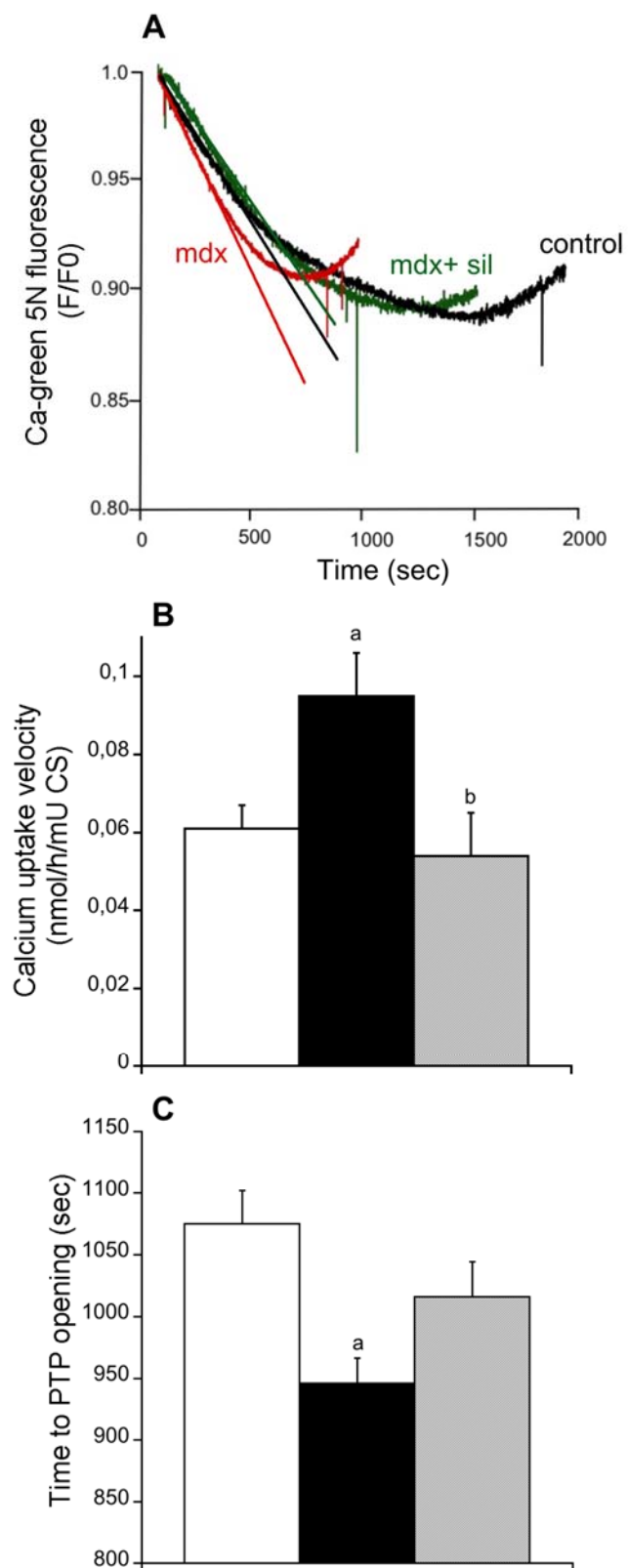


Figure 1 supplementary material

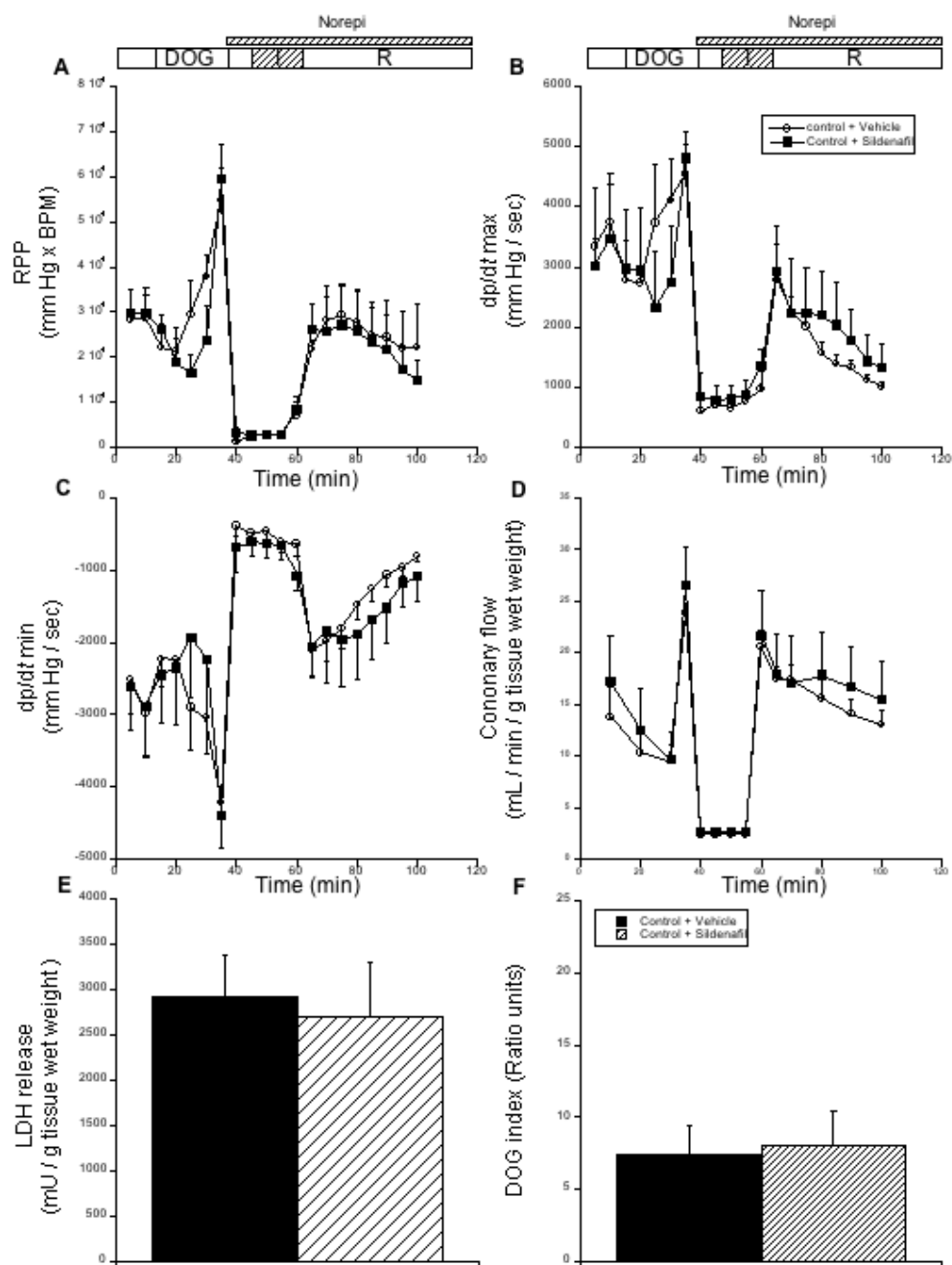


FIGURE 1 Supplementary material



## 5.4 Article 4

### Titre

Mitochondrial targeted antioxidant do not prevent contractile dysfunction and cell death activation following ischemia-reperfusion in the *mdx* heart .

### Auteurs

Alexis Ascah, Frédéric Daussin, Richard Godin, Sonia Deschênes and Yan Burelle

### Journal

En préparation pour publication

**Mitochondrial targeted antioxidant do not prevent contractile dysfunction and cell death activation following ischemia-reperfusion in the *mdx* heart .**

Alexis Ascah, Frédéric Daussin, Richard Godin, Sonia Deschenne and Yan Burelle

**Running head:** SS-31 in dystrophic hearts

---

From the Departments of Kinesiology at Université de Montréal.

**Send correspondence to:**  
Yan Burelle, Ph.D, Université de Montréal.

## ABSTRACT

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction have been associated to ischemia-reperfusion (I-R) injuries. In the the *mdx* heart, the murine model of Duchenne muscular dystrophy this relationship appears to be even more critical. Thus, we tested whether SS-31, a mitochondria specific antioxidant that accumulates in the intermembrane space, could attenuate the impact of ischemia-reperfusion on the cardiac muscle in *mdx* mice. After a single injection of SS-31 (3 mg/kg, IP), the heart was perfused using a modified Langendorff method before being subjected to 30 minutes of ischemia followed by reperfusion. Our results indicate that SS-31 treatment did not prevent the exaggerated loss-of-function as measured by the recovery in LVDP following I-R in *mdx* mice. The antioxidant treatment also did not protect from cellular damage that is characteristic of the *mdx* heart in response to I-R. Specifically, the LDH release, the increased mitochondrial permeability transitional pore (mPTP) opening and, the reduction of aconitase activity that is observed post I-R were all unaffected by pre-treatment with SS-31. We also show that although administration of the peptide effectively reduced mitochondrial ROS production in permeabilized heart myofibers from wild-type mice, this effect was not observed in the *mdx*. These results may reflect the dispensability of mitochondrial oxidative stress in mediating cardiac dysfunction following I-R in *mdx*, or, that a single dose 3mg/kg IP of SS-31 is insufficient to attenuate this response. Nonetheless, we confirm that I-R damage in the *mdx* heart is mediated by PTP opening.

## Keywords:

Ischemia-Reperfusion, SS-31, mPTP, oxidative stress, Duchenne Muscular Dystrophy

## INTRODUCTION

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is an inherited X-linked disease resulting in the absence of functional dystrophin, a cytoskeletal protein that is critical for maintenance of cell membrane stability in skeletal and cardiac muscle cells (Petrof BJ et al 1993). Although the first clinical manifestations are generally related to skeletal muscle weakness, cardiac involvement is inescapable with age as heart failure is the cause of death in 30% of DMD patients (de Kermadec JM et al. 1994, Mukoyama M et al. 1987, Nigro G et al. 1983 and Nigro G et al. 1990}. Although the primary deficit responsible for cardiomyopathy is undoubtedly the lack of dystrophin, the cellular mechanisms leading to dilated cardiomyopathy remain poorly understood.

The lack of dystrophin results in an increased vulnerability to mechanical stress that has been observed in skeletal muscle (Shkryl VM et al. 2009) as well as in the heart on isolated cardiomyocytes (Jung C et al. 2008 and Fanchaouy M et al 2009) and in the whole organ both *in vivo* (Khairallah M et al. 2008) and *ex vivo* in isolated perfused working heart (Khairallah M et al. 2007 and Khairallah M et al. 2008) as well as in ischemia-reperfusion (I-R) (Ascah A et al. 2010). This vulnerability to stress is present at a young age (*i.e.* 12 weeks), well before clinical signs of cardiomyopathy appear (Li W et al. 2009), suggesting that it could play a role in the progression of the pathology. The group of Shirokova N. (Jung C et al. 2008) also reported an elevated ROS production in *mdx* cardiomyocytes that is greatly exacerbated after a mechanical osmotic stress. In line with this, we and others have observed a decreased activity of aconitase, a citric cycle enzyme whose activity is inhibited by ROS, in the *mdx* heart following a protocol of perfusion in working mode (Khairallah M et al. 2007) or following I-R (Ascah A et al. 2010 and Burelle Y et al. 2010). Excessive ROS production is known to act synergistically with calcium

to induce PTP opening and activation of cell death (Lemasters JJ et al. 2009). Because of the potential role for ROS in the DMD disease progression, there has been a growing interest in using antioxidant treatments (Whitehead NP et al. 2008 and Williams IA et al. 2007) including mitochondria-targeted peptides such as the Coenzyme Q10 analog, idebenone (Buyse GM et al. 2009). Indeed, Buyse et al. (Buyse GM et al. 2009) recently demonstrated that a long-term treatment with idebenone in *mdx* mice reduces inflammation, cardiac systolic dysfunction and mortality in response to dobutamine-induced hemodynamic stress. Consequently, this study aims at assessing the effectiveness of a more specific mitochondria-targeted antioxidant, SS-31 (a peptide developed by Szeto and Schiller), in protecting the *mdx* heart from I-R injury. This peptide has already been shown to protect against neurodegenerative diseases involving mitochondrial oxidative stress like amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Parkinson (Petri S et al. 2006 and Szeto HH 2008 Ann N Y Acad Sci ). It can also protect the normal heart from I-R injury, in which oxidative stress is also known to be important (for review Szeto 2008 Antioxid Redox Signal). The cardioprotective attributes of this peptide are thought to be derived from its ability to hinder the vicious cycle of increased ROS production and susceptibility to mPTP opening (Szeto 2008 Antioxid Redox Signal).

In the present study, we use the mitochondrial [ $^3\text{H}$ ]-deoxyglucose ([ $^3\text{H}$ ]-DOG) entrapment method to directly quantify PTP opening, in Langendorff perfused *mdx* hearts submitted to ischemia-reperfusion. We hypothesize that the mitochondrial antioxidant SS-31 will improve mitochondrial resistance to stress-induced mPTP opening by preventing an acute augmentation of mitochondrial ROS production, thus preventing excessive cell death which would translate into improved cardiac function during reperfusion.

## METHODS

### Animal care and drug treatment:

All experiments were approved by the Université de Montréal Institutional Animal Care Committee and conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care. The male *mdx* and C57BL/10<sup>ScSn</sup> mice used in this study originated from a colony maintained at the Royal Victoria Hospital, in Montreal, Canada. To insure that dystrophic hearts were free of cardiomyopathy, all experiments were conducted at 12 weeks of age at a time when echocardiographic and histological abnormalities are not yet present (Li W et al. 2009). Thirty minutes prior sacrifice, mice were administered either a single i.p. injection of SS-31 (3 mg/kg, kindly provided by Dr. Deschepper) dissolved in saline, or the vehicle alone.

### Isolated heart perfusion

Mice were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine, (9 and 1 mg/100 g body weight) and heparinized (5 U/g body weight) 15 min prior to surgery. Following thoracotomy, the aorta was rapidly cannulated and cardiac arrest was induced with ice-cold saline with 15mM glucose. Hearts were then transferred onto the perfusion apparatus and the coronary arteries perfused with KH buffer (in mM: 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose, 1.5 lactate, 0.2 pyruvate, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) supplemented with 0.8 nM insulin, and a physiological level of 5 nM norepinephrine (Khairallah M et al. 2007). The perfusion solution was oxygenated with 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub> and maintained at 37 °C throughout the perfusion. Hearts were maintained in a water-jacketed chamber maintained at 37 °C and were not paced. Perfusion pressure was monitored by use of an in-line pressure transducer connected to an in line data acquisition system (Powerlab 8/30, ADInstruments, Colorado Springs, CO). Ventricular pressure was monitored via a

separate pressure transducer connected to a custom-made plastic balloon inserted in the left ventricle via the left atrium. Hearts were submitted to a protocol consisting of 30 min of low-flow ischemia (10% of pre-ischemic flow delivered by means of a syringe pump), followed by 40 min of reperfusion. Mechanical stress was induced by a constant infusion of norepinephrine (100  $\mu$ M) delivered by means of a syringe pump during the entire I-R protocol starting 5 min prior to ischemia. Coronary effluent was collected at 10-min interval throughout the perfusion for measurements of coronary flow and determination of LDH release. LDH activity in the perfusate was measured spectrophotometrically on the same day using a method previously described (Marcil M et al. 2006) and LDH release was expressed in  $\text{mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  of wet tissue.

#### **Measurement of PTP opening *in situ* with 2-deoxy [ $^3\text{H}$ ]glucose:**

PTP opening *in situ* was assessed using an adaptation of the [ $^3\text{H}$ ]-DOG entrapment method previously used in our laboratory in rats (Marcil M et al. 2006). This method relies on the principle that once taken up by cardiac cells through glucose transporters, the non-metabolizable glucose analog [ $^3\text{H}$ ]-DOG is trapped in the cytosol as [ $^3\text{H}$ ]DOG-6P. Given the very low permeability of mitochondria to sugars, [ $^3\text{H}$ ]DOG-6P does not normally enter the mitochondria unless PTP opening occurs. The extent to which [ $^3\text{H}$ ]DOG-6P is entrapped within mitochondria is thus used as an indicator of the number of mitochondria that have undergone PTP opening in response to a cardiac insult.

In order to load cardiomyocytes with [ $^3\text{H}$ ]DOG prior to ischemia-reperfusion, hearts were initially perfused for 10 min with regular KH buffer. Following this stabilization period, hearts were perfused for 20 min with KH buffer supplemented

with 0.5 mM 2-deoxy [ $^3\text{H}$ ]glucose ( $1.0 \mu\text{Ci.mL}^{-1}$ ). Perfusion was continued for an additional 5 minutes with normal KH in order to wash-out extra-cellular [ $^3\text{H}$ ]DOG prior to the ischemia-reperfusion protocol described above. In a subset of experiments hearts were sampled after the wash-out period for the measurement of baseline mitochondrial [ $^3\text{H}$ ]DOG entrapment.

At the end of perfusion hearts were removed, weighted and homogenized in 5 ml of ice-cold sucrose buffer (in mM: sucrose 300, Tris-HCl 10, EGTA 2, pH 7.4) with a polytron homogenizer (setting 3 for 5 sec) and volume was then completed to 10 ml. An aliquot of the crude homogenate were retained for measurements of [ $^3\text{H}$ ]DOG and the remainder was immediately centrifuged at 800 g for 5 min to remove cellular debris. The supernatant was recovered and centrifuged at 10 000 g for 5 min. The mitochondrial pellet obtained was washed twice in 15 ml of sucrose buffer and centrifuged at 10 000 g for 5 min. The final mitochondrial pellet was re-suspended in 600  $\mu\text{L}$  of sucrose buffer. 50 and 550  $\mu\text{L}$  of this mitochondrial suspension was retained for the measurement of citrate synthase (CS) activity and determination of [ $^3\text{H}$ ]DOG respectively. For the measurement of [ $^3\text{H}$ ]DOG, crude homogenate and mitochondrial samples were mixed with an equal volume of 5% (w/v) perchloric acid and centrifuged at 10 000 g for 5 min. Radioactivity of the supernatant (0.5 to 1.0 mL samples) was counted in 5 ml of scintillate.

### **Mitochondrial [ $^3\text{H}$ ]DOG entrapment**

Calculation of the DOG index was performed as described previously. This index, which reflects the number of mitochondria in which PTP opening occurred over the perfusion protocol, was expressed as follows:



$$\text{DOG index} = [10^5 \times \text{mitochondrial } [^3\text{H}]\text{DOG} / \text{tissue } [^3\text{H}]\text{DOG}] / \text{CS recovery per g of heart}$$

where mitochondrial and tissue [ $^3\text{H}$ ]DOG are expressed in d.p.m per unit of CS in the mitochondrial fraction and d.p.m per g of wet ventricular tissue respectively. This calculation allows mitochondrial [ $^3\text{H}$ ]DOG entrapment to be normalized for the concentration of mitochondria present in the mitochondrial fraction and for possible differences in the tissue uptake of the tracer (Griffiths EJ and Halestrap AP 1995). Furthermore, this index is corrected by the amount of CS recovered per gram of heart, which is an indicator of mitochondrial yield (Javadov SA et al. 2003). This correction provides a more valid index of PTP opening since it takes into account [ $^3\text{H}$ ]DOG entrapment in mitochondria that become totally disrupted as a result of stress and are not recovered during isolation (Javadov SA et al. 2003 and Halestrap AP et al 2004).

#### **Activity of caspases and aconitase**

The activity of caspase 9 and 3 were measured fluorimetrically on a plate reader. Briefly, 100  $\mu\text{l}$  of the cytosolic fraction was incubated with 100  $\mu\text{M}$  of the fluorogenic 7-amino-4- trifluoromethyl coumarin (AFC)-conjugated substrate (Ac-DEVD-AFC for caspase-3, Ac-LEHD-AFC for caspase-9, Alexis Corp., San Diego, CA) at 37° C for 1 h. Recombinant caspase-3 and -9 were used as positive controls. Changes in fluorescence were recorded at a wavelength of 390 nm for the excitation, and 520 nm for the emission. Caspase activity was expressed as the rate of change in fluorescence. Aconitase activity was measured spectrophotometrically in the cytosolic and mitochondrial fractions using a coupled enzyme assay as described previously (Khairallah M et al. 2007). All measurements were performed in duplicate.

### **Measurement of ROS production in permeabilized heart bundles**

Fibers bundles were prepared from the endocardium of the left ventricular free wall taken from freshly isolated hearts as described previously (Picard M et al. 2008). Briefly, fibers were gently teased apart in medium A (in mM: 2.77 CaK<sub>2</sub>EGTA, 7.23 K<sub>2</sub>EGTA, 6.56 MgCl<sub>2</sub>, 20 taurine, 0.5 DTT, 50 K-MES, 20 imidazole, 5.3 Na<sub>2</sub>ATP and 15 creatine-phosphate, pH 7.3 at 4°C). Fibers were then permeabilized in medium A with 50 µg/ml of saponin for 30 minutes. Following a 10 min wash in medium B (in mM: 2.77 CaK<sub>2</sub>EGTA, 7.23 K<sub>2</sub>EGTA, 1.38 MgCl<sub>2</sub>, 20 taurine, 0.5 DTT, 100 K-MES, mM imidazole, 3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.3 at 4°C), ghost fibers devoid of myosin were prepared as follows: fibers were rinsed three times in medium C (in mM: 80 K-MES, 50 HEPES, 20 taurine, 0.5 DTT, 10 MgCl<sub>2</sub>, 10 ATP, pH 7.3 at 4°C) and then incubated for 30 min at 4 °C in a high KCl medium to solubilize myosin (in mM: 800 KCl, 50 HEPES, 20 taurine, 0.5 DTT, 10 MgCl<sub>2</sub>, 10 ATP, pH 7.3 at 4°C). Finally fibers were washed three times in a sucrose medium (in mM: 250 sucrose, 10 Tris base, 0.1 EGTA, pH 7.4 at 4°C) and kept on ice until use (within 6 hours). Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release was determined by measuring the rate of increase in Amplex-red (20 µM) fluorescence in permeabilized fibers (0.3-1.0 mg dry weight) incubated in 600 µL of K-MES buffer (in mM: 110 K-MES, 35 KCl, 1 EGTA, 5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, and 0.5mg/ml BSA, pH 7.3, 37 °C) supplemented with 1.2 U/mL horseradish peroxidase (Anderson EJ and Neuffer PD 2006 and Picard M et al 2008).

### **Measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in permeabilized heart bundles**

To compare the mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging capacity, permeabilized fiber bundles were placed in 500 µL of buffer Z containing 50 µM pyruvate and 20 µM malate in a thermally controlled chamber set at 37°C with continuous stirring as previously described (Anderson EJ and Neuffer PD 2006). An aliquot was sample

before adding 40  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and a new aliquot was sample 60 sec after and placed into 96-well plate on ice.  $\text{H}_2\text{O}_2$  content was measured spectrophotometrically in a plate reader with 10  $\mu\text{M}$  of Amplex Red and 0.5 U/mL HRP. The total amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenged by mitochondria was determined by subtraction of initial and final  $\text{H}_2\text{O}_2$  quantity in aliquots. At the end of each test, fibers were carefully removed from the micro cuvette, blotted and dried for determination of fiber weight. All measurements were performed at least in triplicates and results were expressed in nmol/min/mg dw.

### Statistical analyses

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical differences were analyzed using one-way ANOVA except for myocardial function, where the main effects of time and experimental group as well as the time-experimental group interactions were tested by repeated-measures analysis of variance (Statistica package). Tukey post hoc tests were used to identify the location of significant differences ( $P < 0.05$ ).

## RESULTS

### Cardiac function and LDH release

The functional response of control and *mdx* hearts to the *ex vivo* perfusion protocol is shown in Figure 1. Myocardial function did not differ significantly between control and *mdx* hearts under baseline normoxic conditions in absence of adrenergic stimulation, except from a greater coronary flow in *mdx* hearts. However, consistent with the well-known sarcolemmal instability of myocytes, the release of LDH in the coronary effluent was substantially higher in *mdx* relative to controls before ischemia and in reperfusion (Figure 1C and D). Infusion of norepinephrine starting five min prior to ischemia had a significant inotropic and chronotropic effect in normal hearts, but this response was significantly blunted in *mdx* hearts. Following

low-flow ischemia, hearts from *mdx* mice displayed a markedly lower recovery of function than their counterparts from normal mice (Figure 1A). Treatment of animals with SS-31 30 min prior to perfusion did not affect heart function before ischemia or during reperfusion. It also did not affect the inotropic response to norepinephrine prior to ischemia or the LDH release but, it did reduce coronary flow significantly throughout the perfusion protocol.

### **PTP opening and caspase 3 and 9 activation**

As expected by our previous work, I-R induced an increase in the occurrence of PTP opening that was more than 2 fold greater in hearts from *mdx* mice compared to their normal counterparts (Figure 2B). SS-31 treatment did not alter the enhanced PTP opening in dystrophic hearts. However, there was a tendency for SS-31 to attenuate caspase 3 and 9 activation in the cytosolic fraction ( $p = 0.16$  and  $0.06$ ) (Figure 3). A significant inverse correlation ( $R^2 = 0.37$   $p < 0.05$ ) was observed between the level of functional recovery and the degree of PTP opening when data from all experimental groups were pooled.

### **Aconitase activity**

We next investigated whether SS-31 treatment could attenuate the oxidative stress in the cardiac *mdx* mitochondria after the I-R protocol. As shown in Figure 4B and C, the activity of aconitase, measured in mitochondria following I-R was significantly reduced in dystrophic hearts treated with the peptide, suggesting an accentuation of oxidative stress. Importantly, this was not observed in the cytosolic fraction possibly indicating a direct impact of SS-31 on mitochondria-specific oxidative stress (Figure 4A).

### **ROS production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in isolated fibers.**

In separate experiments permeabilized cardiac fiber bundles were prepared from freshly isolated hearts in order to determine whether SS-31 treatment could reduce mitochondrial *in situ* ROS production. In C57BL/10<sup>ScSn</sup> mice, we found that a single SS-31 IP injection reduced mitochondrial ROS production in almost all respiratory states when compared to permeabilized heart fibers from animals who received the control treatment (Figure 5A). However, SS-31 did not alter ROS production as well as the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging in heart mitochondria from *mdx* mice (Figure 5B and C)

## **DISCUSSION**

Results from the present study give support to the idea that opening of the PTP is enhanced in the hearts of young *mdx* mice prior to any signs of cardiomyopathy, and that it contributes to cardiac dysfunction following I-R. The increased oxidative stress, in dystrophic cardiomyocytes, a factor known to promote PTP opening, is thought to contribute to the development of the pathology. This is why we test the mitochondria targeting antioxidant SS-31 but we didn't found any cardioprotective effect with acute treatment in *mdx* mice.

### **Role of mitochondrial function and PTP opening in dystrophic cardiomyopathy**

Evidence obtained in skeletal muscle from *mdx* mice (Millay DP et al. 2008 and Reutenauer J et al. 2008) and other forms of muscular dystrophy, including Bethlem myopathy, Ullrich congenital dystrophy, and Limb-girdle muscular dystrophy (Angelin A et al. 2008, Irwin WA et al. 2003 and Hicks D et al. 2009), have led to the suggestion that PTP opening plays a role in the dystrophic phenotype. In particular, studies by Millay et al. (Millay DP et al. 2008) and Reuteneuer et al. (Reutenauer J et al. 2008) showed that treatment of *mdx* mice with Debio 025, which

inhibits PTP opening by binding to cyclophilin-D, reduced fibrosis and central nucleation as well as improving skeletal muscle force development. In the sarcoglycan-null mouse (*Scgd*<sup>-/-</sup>), a more severe and rapidly evolving model of dystrophy, inactivation of the *Ppif* gene encoding the PTP-regulating protein cyclophilin-D was shown to reduce cardiac fibrosis and improve ejection fraction observed in the late disease stages (Millay DP et al. 2008). Our direct quantification of PTP opening in the whole organ using an adaptation of the [<sup>3</sup>H]-DOG method extends these previous observations by showing that enhanced permeability transition also occurs in the heart of *mdx* mice in response to acute stress, and is correlated with the level of functional impairment (Ascah A et al. 2010).

### **Ca<sup>2+</sup> homeostasis**

One of the important factors underlying enhanced opening of the PTP in the dystrophic heart is undoubtedly dysregulation of cellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Indeed, it is well established that mechanical stress increases Ca<sup>2+</sup> influx in dystrophic myocytes. It is therefore likely that the cellular Ca<sup>2+</sup> loading that normally occurs in the heart during I-R (Miyata H et al 1992 and Griffiths EJ et al. 1995) is exacerbated in the dystrophic heart. This would result in a mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload that would in turn, promote opening of the PTP (Ascah A et al. 2010). We have previously reported that the rate of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake was greater in permeabilized fibers from non-perfused *mdx* hearts than in fibers from their control counterparts; this observation was indeed associated with premature opening of the PTP (Ascah A et al 2010). While the mechanism underlying this enhanced Ca<sup>2+</sup> uptake velocity remains to be clarified, these results raise the possibility of a two hit mechanism by which enhanced mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake kinetics in the dystrophic heart exacerbates the impact of cellular Ca<sup>2+</sup> overload on PTP opening susceptibility.

### **Oxidative stress**

Another factor that act synergistically with calcium and contribute to PTP opening is the presence of enhanced oxidative stress (for review; Lemasters JJ et al. 2009). Rando TA et al. have shown that myotube from *mdx* are more vulnerable to oxidative stress than controls (Rando TA et al. 1998). Our previous experiments demonstrate an augmented oxidative stress in the mitochondria as shown by a reduction in the aconitase activity following I-R. (Ascah A et al. 2010). Enhanced mitochondrial ROS production is the most likely candidate to contribute to the acute oxidative stress that is observed post I-R.

The present study shows that IP administration of SS-31 in C57BL/10<sup>ScSn</sup> mice reduces production of ROS in isolated heart bundle as previously shown (Szeto HH 2006). Surprisingly, the same peptide administration did not result in lower ROS production nor amelioration of they H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging capacity in the *mdx* heart bundle. Additionally, it did not protect the *mdx* heart from cellular integrity disruption, PTP opening, nor have any positive impact on cardiac function recovery following I-R. In line with the inability of the peptide to diminish ROS production in *mdx*, we observed a significant decrease in aconitase activity in the mitochondrial fraction following the I-R indicating increase in mitochondrial oxidative stress. In the face of these results that are contrary to what we expected, we tested the purity of SS-31. We confirm that our results, which may appear as a pro-oxidant status following SS-31 treatment, were not the product of peptide degradation. Although we had anticipated an antioxidant cardioprotective effect of SS-31, this study does not rule out the possibility that a different administration protocol could provide the

expected cardioprotective effect in the *mdx* mouse. Indeed, it was shown that IP injection of SS-31 30min before aorta ligation *in vivo* (Cho J et al. 2007) is cardioprotective. The systemic absorption of these peptides following intraperitoneal administration is rapid, with peak plasma levels observed before 20 min (Szeto HH 2008 Antioxid Redox Signal) and despite the relatively short half-lives, a single subcutaneous dose (1 mg/kg) of SS-02 (a derivate of SS-31) was found to produce significant analgesic response for more than 12 h in mice (Zhao GM et al. 2002). Alternatively, it is possible, that the peptide affects dystrophic tissues differently than control tissues. It is also conceivable, that the calcium dysregulation is more important than oxidative stress in this pathology. Unlike sildenafil, which we have previously shown confers cardioprotection to I-R in *mdx*, SS-31 has never been shown to improve  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and therefore may not be able to prevent the excessive loss of function in this experimental setting.

## CONCLUSION

In conclusion, a single dose 3mg/kg I.P. of SS-31 has no cardioprotective effect on the *mdx* heart submit to an I-R or on baseline ROS production. Further experiments will be necessary to understand if chronic injection of SS-31 can have better result or if the peptide is not well designed for DMD per se.

## ACKNOWLEDGEMENTS

YB is a Junior II Investigator of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). AA is supported by a Ph.D fellowship from NSERC. Dr.Schiller for the quality control test on SS-31.



## REFERENCES

- Anderson EJ & Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *American journal of physiology*. 2006 290, C844-851.
- Angelin A, Bonaldo P, Bernardi P. Altered threshold of the mitochondrial permeability transition pore in Ullrich congenital muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jul-Aug;1777(7-8):893-6.
- Ascah A, Khairallah M, Daussin F, Bourcier-Lucas C, Godin R, Allen BG, Petrof BJ, Des Rosiers C, Burelle Y. Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Oct 22.
- Burelle Y, Khairallah M, Ascah A, Allen BG, Deschepper CF, Petrof BJ, Des Rosiers C. Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Feb;48(2):310-21.
- Cho J, Won K, Wu D, Soong Y, Liu S, Szeto HH, Hong MK. Potent mitochondria-targeted peptides reduce myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis*. 2007 May;18(3):215-20.
- de Kermadec JM, Bécane HM, Chénard A, Tertrain F, Weiss Y. Prevalence of left ventricular systolic dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: an echocardiographic study. *Am Heart J*. 1994 Mar;127(3):618-23.
- Fanchaouy M, Polakova E, Jung C, Ogrodnik J, Shirokova N, Niggli E. Pathways of abnormal stress-induced Ca<sup>2+</sup> influx into dystrophic *mdx* cardiomyocytes. *Cell Calcium*. 2009 Aug;46(2):114-2.
- Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995 Apr 1;307 ( Pt 1):93-8.
- Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 15;61(3):372-85.
- Hicks D, Lampe AK, Laval SH, Allamand V, Jimenez-Mallebrera C, Walter MC, Muntoni F, Quijano-Roy S, Richard P, Straub V, Lochmüller H, Bushby KM. Cyclosporine A treatment for Ullrich congenital muscular dystrophy: a cellular study of mitochondrial dysfunction and its rescue. *Brain*. 2009 Jan;132(Pt 1):147-55.
- Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, Braghetta P, Columbaro M, Volpin D, Bressan GM, Bernardi P, Bonaldo P. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet*. 2003 Dec;35(4):367-71.
- Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol*. 2003 Jun 1;549(Pt 2):513-24.

Jung C, Martins AS, Niggli E, Shirokova N. Dystrophic cardiomyopathy: amplification of cellular damage by Ca<sup>2+</sup> signalling and reactive oxygen species-generating pathways. *Cardiovasc Res*. 2008 Mar 1;77(4):766-73.

Khairallah M, Khairallah R, Young ME, Dyck JR, Petrof BJ, Des Rosiers C. Metabolic and signaling alterations in dystrophin-deficient hearts precede overt cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Aug;43(2):119-29.

Khairallah M, Khairallah RJ, Young ME, Allen BG, Gillis MA, Danialou G, Deschepper CF, Petrof BJ, Des Rosiers C. Sildenafil and cardiomyocyte-specific cGMP signaling prevent cardiomyopathic changes associated with dystrophin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 13;105(19):7028-33.

Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhong Z, Nieminen AL. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Nov;1787(11):1395-401.

Li W, Liu W, Zhong J, Yu X. Early manifestation of alteration in cardiac function in dystrophin deficient *mdx* mouse using 3D CMR tagging. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2009 Oct 22;11(1):40.

Marcil M, Ascah A, Matas J, Bélanger S, Deschepper CF, Burelle Y. Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Dec;41(6):998-1009.

Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, Sweeney HL, Robbins J, Molkentin JD. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med*. 2008 Apr;14(4):442-7.

Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. Relation of mitochondrial and cytosolic free calcium to cardiac myocyte recovery after exposure to anoxia. *Circ Res*. 1992 Sep;71(3):605-13.

Mukoyama M, Kondo K, Hizawa K, Nishitani H. Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan. *J Neurol Sci*. 1987 Nov;81(2-3):155-8.

Nigro G, Comi LI, Limongelli FM, Giugliano MA, Politano L, Petretta V, Passamano L, Stefanelli S. Prospective study of X-linked progressive muscular dystrophy in Campania. *Muscle Nerve*. 1983 May;6(4):253-62.

Nigro G, Comi LI, Politano L, Bain RJ. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol*. 1990 Mar;26(3):271-7.

Petri S, Kiaei M, Damiano M, Hiller A, Wille E, Manfredi G, Calingasan NY, Szeto HH, Beal MF. Cell-permeable peptide antioxidants as a novel therapeutic approach in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 2006 Aug;98(4):1141-8.

Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3710-4.

Picard M, Csukly K, Robillard ME, Godin R, Ascah A, Bourcier-Lucas C & Burelle Y. Resistance to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 295, R659-668

Rando TA, Disatnik MH, Yu Y, Franco A. Muscle cells from *mdx* mice have an increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscul Disord*. 1998 Feb;8(1):14-21.

Reutenauer J, Dorchies OM, Patthey-Vuadens O, Vuagniaux G, Ruegg UT. Investigation of Debio 025, a cyclophilin inhibitor, in the dystrophic *mdx* mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *Br J Pharmacol*. 2008 Oct;155(4):574-84.

Shkryl VM, Martins AS, Ullrich ND, Nowycky MC, Niggli E, Shirokova N. Reciprocal amplification of ROS and  $\text{Ca}^{2+}$  signals in stressed *mdx* dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch*. 2009 Sep;458(5):915-28.

Szeto HH. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. *AAPS J*. 2006 Apr 21;8(2):E277-83.

Szeto HH. Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Mar;10(3):601-19.

Szeto HH. Development of mitochondria-targeted aromatic-cationic peptides for neurodegenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec;1147:112-21.

Whitehead NP, Pham C, Gervasio OL, Allen DG. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in *mdx* mice. *J Physiol*. 2008 Apr 1;586(7):2003-14.

Williams IA, Allen DG. The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient *mdx* mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Sep;293(3):H1969-77.

Zhao GM, Wu D, Soong Y, Shimoyama M, Berezowska I, Schiller PW, and Szeto HH. Profound spinal tolerance after repeated exposure to a highly selective mu-opioid peptide agonist: role of delta-opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 302: 188–196.

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1757(5-6):509-17.

## LEGEND

**Figure 1: SS-31 did not affect cardiac function and do not prevents sarcolemmal damage in *mdx* hearts submitted to ischemia-reperfusion.** The figure shows the evolution of rate pressure product (RPP: panel A), coronary flow (panel B), and release of LDH in the coronary effluent in time (panel C) and total (panel D) in sham, *mdx* and *mdx* treated with SS-31 hearts submitted to low flow ischemia in presence of adrenergic stress. Following the initial 10-min period of stabilization, hearts were perfused with KH buffer containing [ $^3$ H]DOG as indicated. Perfusion was switched back to normal KH buffer for 5 min prior to ischemia in order to wash out extra-cellular [ $^3$ H]DOG. During washout, the infusion of norepinephrine (100  $\mu$ M) was started and maintained during I-R. a: significantly different from control ( $P<0.05$ )

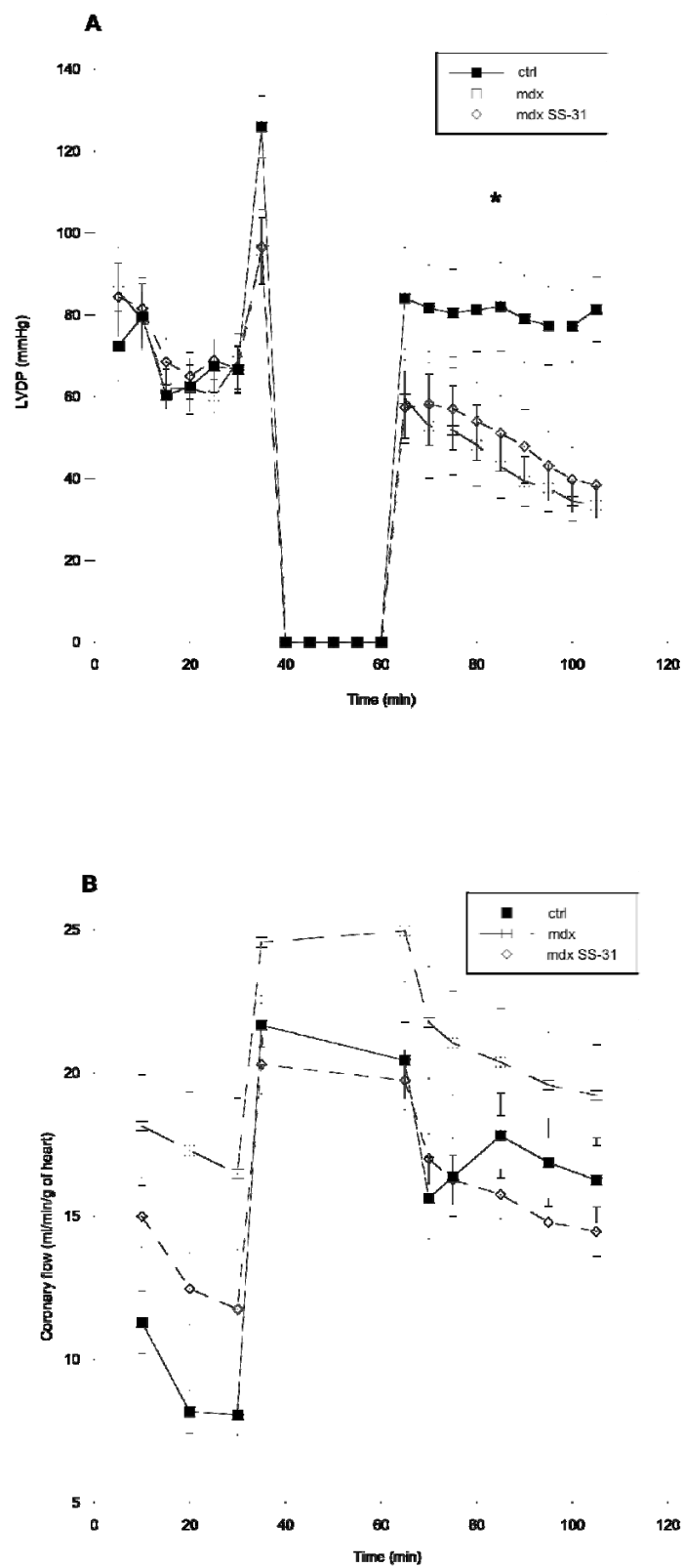
**Figure 2: SS-31 do not prevents excessive opening of the PTP in the dystrophic heart following ischemia-reperfusion.** Panel A shows the principle of the mitochondrial [ $^3$ H]-deoxyglucose ([ $^3$ H]-DOG) entrapment method to quantify opening of the PTP perfused hearts. [ $^3$ H]-DOG enters cardiomyocytes through glucose transporters and remains in the cytosol as [ $^3$ H]-DOG-6P, unless opening of the PTP occurs, which results in the equilibration of [ $^3$ H]-DOG-6P between mitochondria and cytosol. Panel B shows the [ $^3$ H]-DOG index expressed in ratio units ([d.p.m. mitochondria / d.p.m. tissue homogenate] / unit CS recovered per g heart) (see methods for further details) in control, *mdx* and *mdx*+SS-31 ( $n= 10-12$  hearts per group). Panel C shows the correlation between the percent recovery of RPP at the end of reperfusion and the PTP opening index. a: significantly different from control ( $P<0.01$ ),

**Figure 3: SS-31 do not prevents excessive activation of mitochondrial cell death signaling by caspases 3 and 9 activation in the dystrophic heart following I-R.** Panel A and B show the activity of caspase 3 and 9 measured in an aliquot of the same fraction that was not treated with protease inhibitors. Results are expressed in fluorescence units per mg of protein. a: significantly different from control ( $P<0.01$ ), b: significantly different from *mdx* treated with vehicle ( $P<0.01$ ).

**Figure 4: SS-31 increase the loss of aconitase activity in the mitochondrial fraction in dystrophic heart following I-R.** The figure shows the activity of aconitase in the cytosolic fraction (Panel A) and in the mitochondrial fraction (Panel B and C) following I-R ( $n=5-7$  hearts per group). a: significantly different from control ( $P<0.05$ ), b: significantly different from *mdx* treated with vehicle ( $P<0.05$ ).

**Figure 5: SS-31 reduces mitochondrial ROS production in control but not *mdx* hearts.** Panel A: Net rate of mitochondrial  $H_2O_2$  release in fibers from control (Panel A)( $n=2$ ) and *mdx* hearts (Panel B)( $n=8$ ) treated with vehicle or SS-31. Following addition of fibers, the following addition sequence was performed: glutamate (5 mM), ADP (1 mM), rotenone (1  $\mu$ M: not shown), succinate (5 mM), CCCP (1  $\mu$ M), antimycin-A (8  $\mu$ M: not shown), TMPD-ascorbate (0.9:9.0 mM) and KCN (0.6 mM). Panel C: Rate of  $H_2O_2$  scavenging by mitochondria with pyruvate-malate (50: 20  $\mu$ M) from *mdx* or *mdx* SS-31 treated heart following addition of 20 nmoles  $H_2O_2$ .

Figure 1



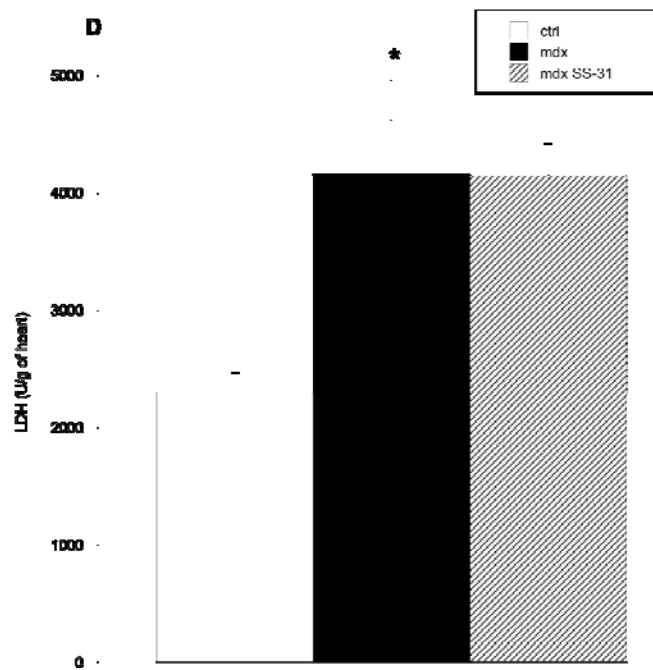
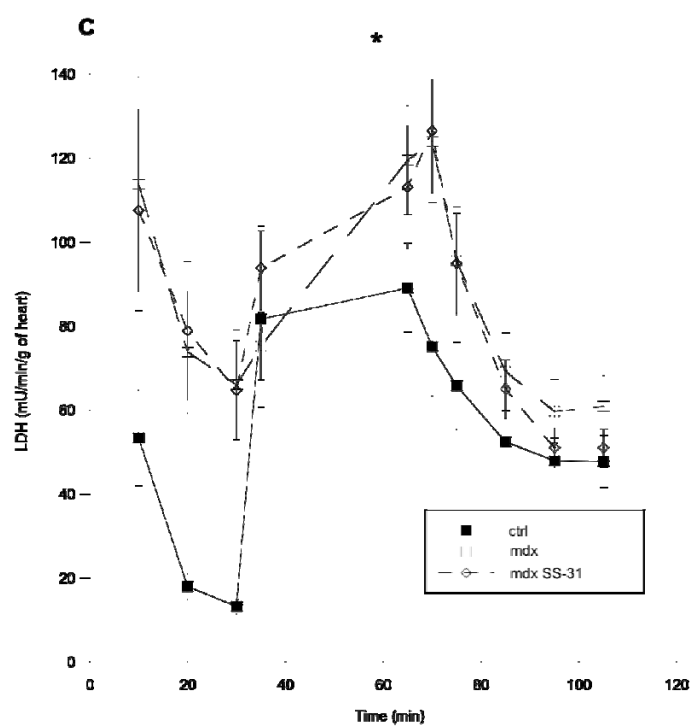


Figure 2

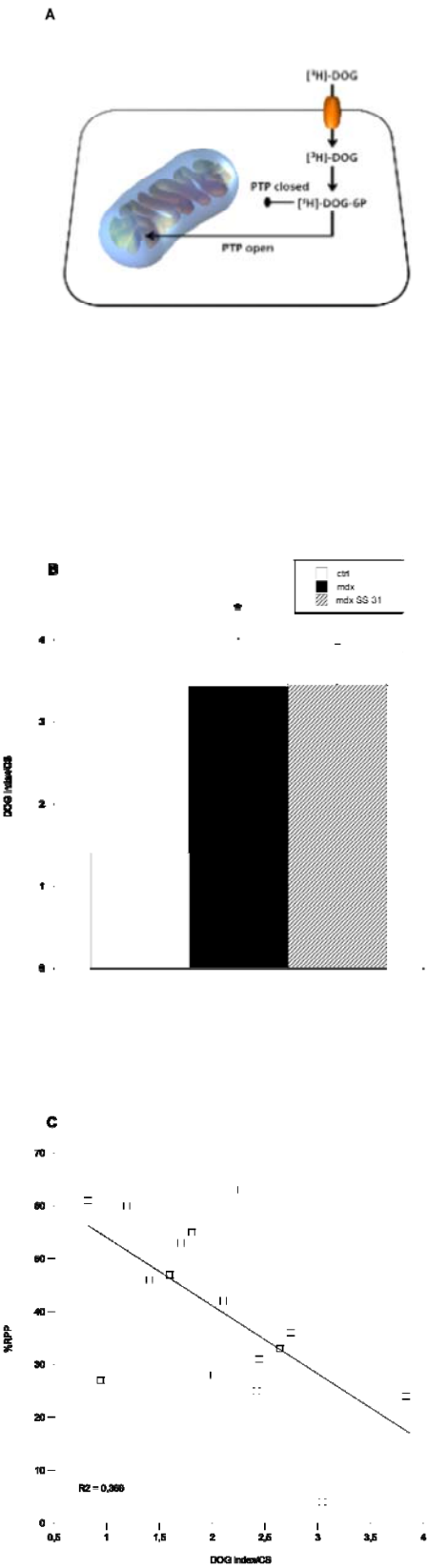




Figure 3

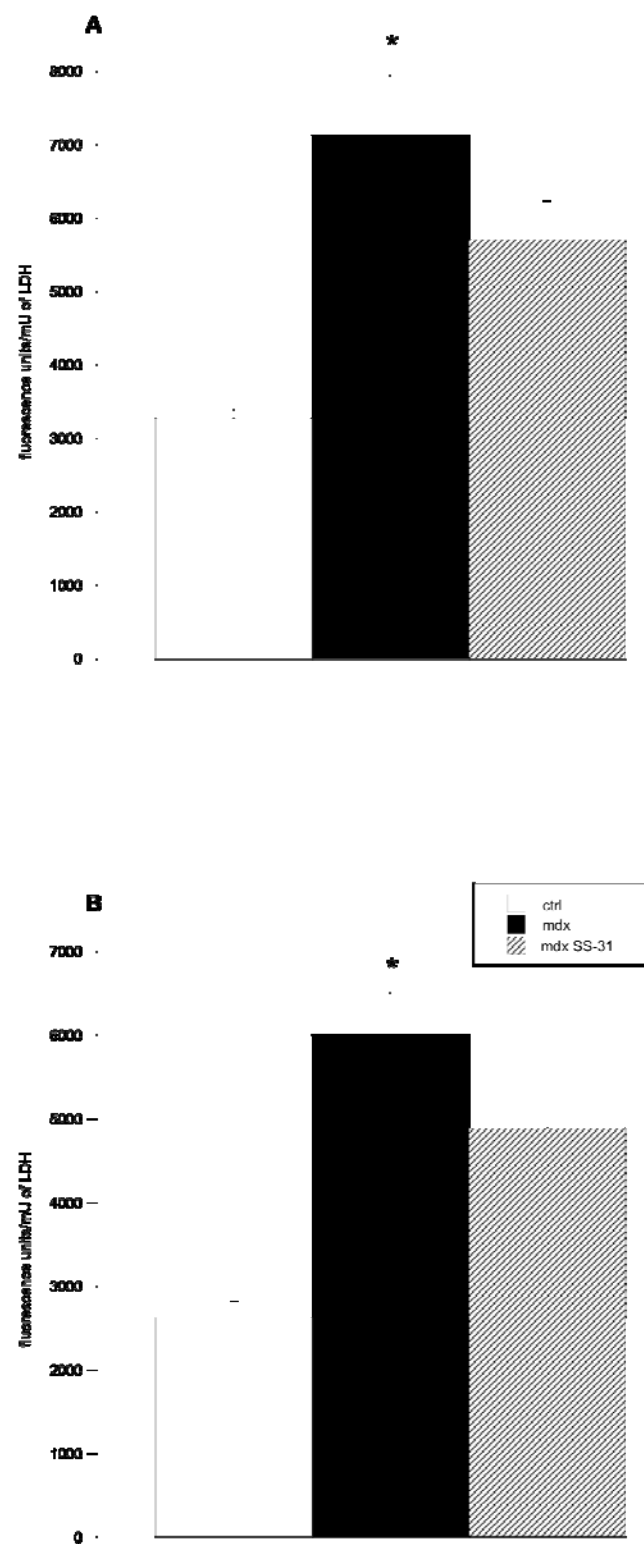


Figure 4

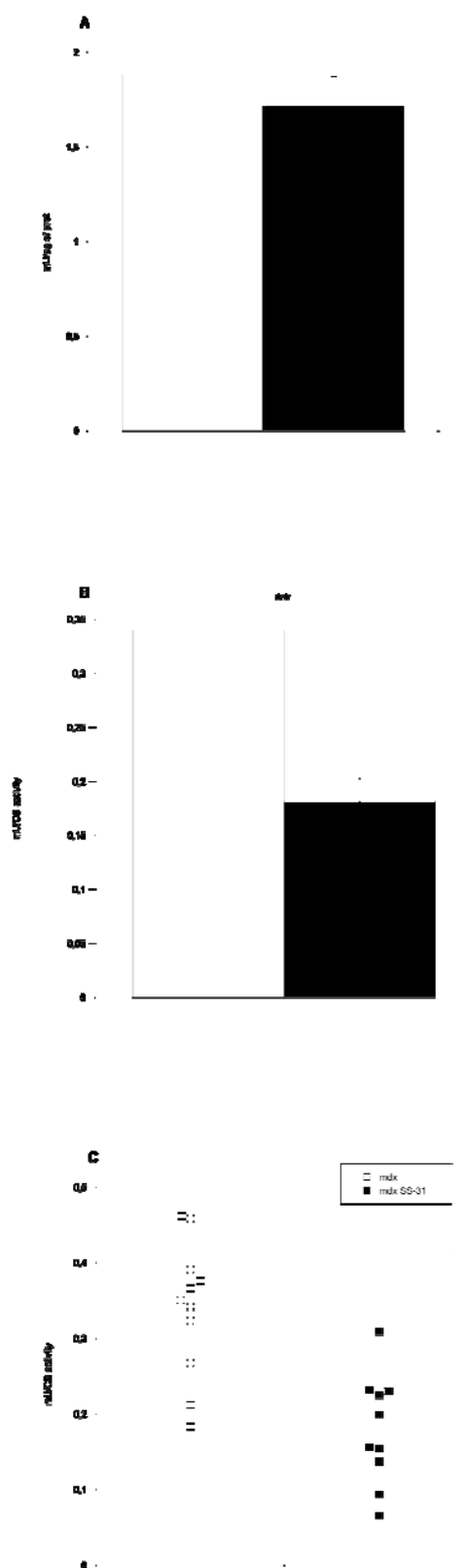
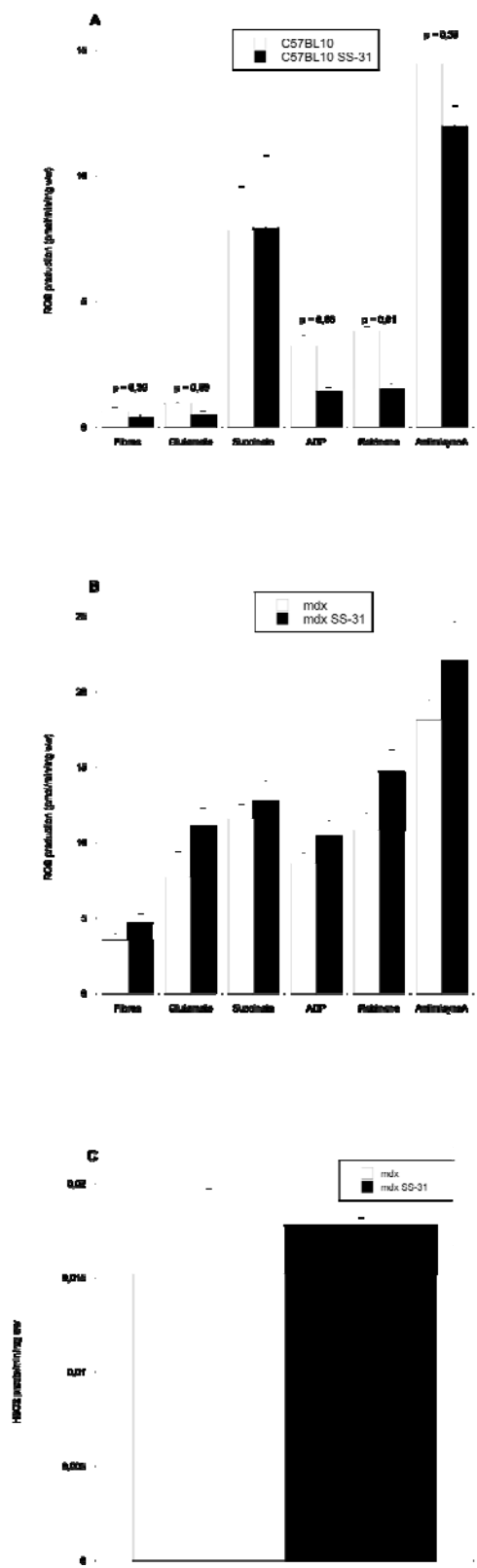


Figure 5



## **Chapitre 3- Discussion de la thèse**

## 6 DISCUSSION

### 6.1 Vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP : un phénomène précoce impliqué dans la progression du remodelage ventriculaire pathologique?

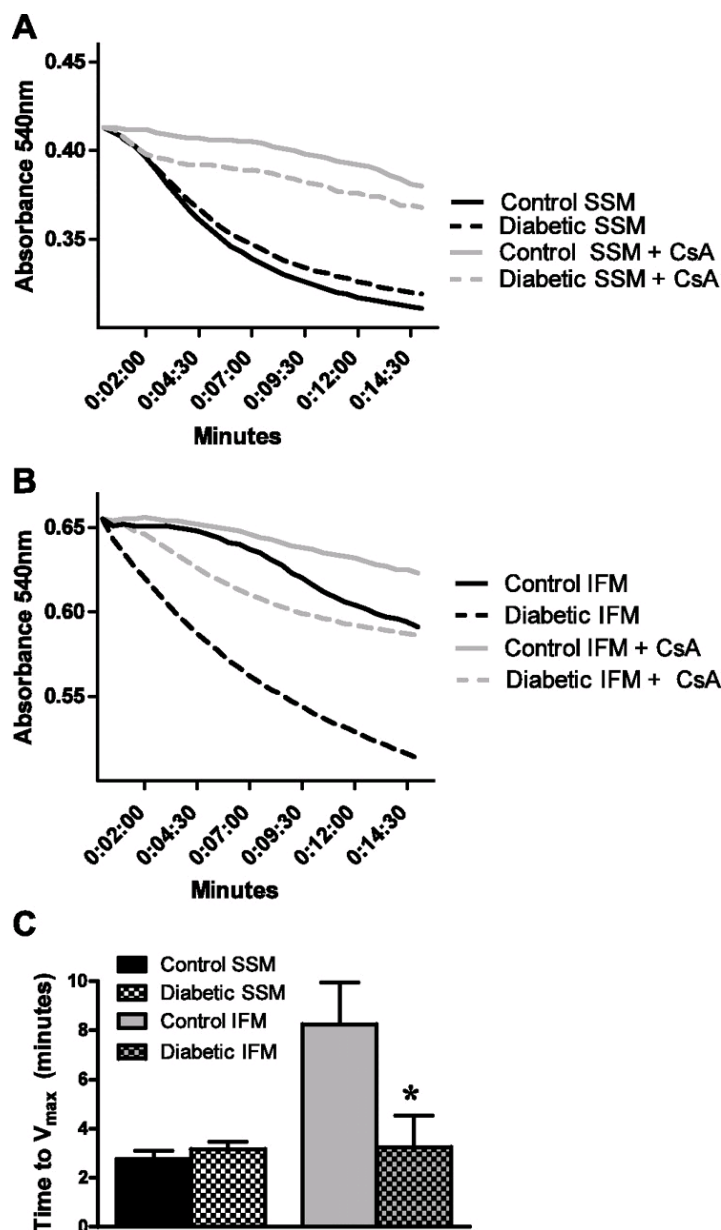
L'hypothèse générale qui a guidé cette thèse de doctorat et qui découle de nos travaux antérieurs était que la vulnérabilité mitochondriale au stress, particulièrement à l'ouverture du PTP, constitue une dysfonction précoce qui pourrait prédisposer aux anomalies mitochondriales multiples, à l'activation des processus de mort cellulaire et, ultimement, aux dysfonctions cardiaques entraînant l'insuffisance.

Dans la première étude de la thèse, nous avons testé cette hypothèse à l'aide de notre modèle, bien établi, de surcharge volumique chronique que nous avons appliqué à deux souches de rats affichant des propensions très différentes au développement de l'insuffisance cardiaque. L'objectif était de déterminer *a)* si la vulnérabilité mitochondriale au stress se développait plus tôt chez les animaux progressant plus rapidement vers l'insuffisance (*i.e.* chez les rats SD *vs* les WKHA) et *b)* si la vulnérabilité mitochondriale observée dans la phase précoce du remodelage progressait vers les dysfonctions mitochondriales plus sévères avec l'avancement de la pathologie. Comme dans nos études antérieures [1, 153] réalisées à l'aide de ce modèle, nous avons clairement démontré que la vulnérabilité à l'ouverture du PTP était significativement augmentée en absence de dysfonctions hémodynamiques majeures et sans qu'il y ait, par ailleurs, d'anomalies au plan de l'enzymologie de la chaîne de transport des électrons et des fonctions respiratoires. Par contre, la comparaison de l'effet de la surcharge volumique chez les animaux WKHA et SD n'a pas permis de mettre en évidence un rôle causal de la vulnérabilité

mitochondriale au stress dans la progression vers l'insuffisance cardiaque. En effet, bien que la vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP était présente plus tôt chez la souche la plus susceptible que chez la souche plus résistante à la progression vers l'insuffisance cardiaque (4 semaines chez la souche SD vs 12 semaines chez la souche WKHA), la sévérité de cette vulnérabilité n'était pas différente d'une souche à l'autre. De plus, nous n'avons pas observé d'aggravation de cette vulnérabilité au cours du remodelage et aucunes des dysfonctions respiratoires sévères typiquement observées dans d'autres modèles expérimentaux (infarctus, surcharge pressive, cardiopathie diabétique [227]) n'étaient présentes dans les cœurs ACF devenus insuffisants.

Cependant, comme nous l'avons montré, l'insuffisance cardiaque dans le modèle ACF survient brusquement et semble reliée à des facteurs mécaniques et structuraux, plutôt qu'aux modifications fonctionnelles et moléculaires du myocarde. Il est donc possible que, dans ce modèle, les mitochondries ne jouent pas un rôle aussi décisif dans la transition vers la décompensation, malgré qu'elles développent initialement une vulnérabilité. Par contre, la contribution de ces organelles pourrait être plus marquante et plus aisément objectivable dans d'autres types de remodelage.

En ce sens, une plus grande susceptibilité à l'ouverture du PTP a récemment été rapportée dans le cœur de souris diabétiques [228]. Dans cette étude, les mitochondries isolées à partir de cœurs de souris ayant été traitées à la streptozotocine étaient plus susceptibles à l'ouverture du PTP induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  que celles des cœurs contrôles (Figure 34). Ceci était accompagné par une plus grande activité des caspases dans le cœur, témoignant de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose.



**Figure 34 : L'ouverture du pore de perméabilité transitionnelle (mPTP) chez les sous-populations de mitochondries.** L'ouverture du mPTP a été évaluée par le gonflement mitochondrial mesuré par spectrophotométrie à 540 nm, à la suite d'un stress oxydatif au t-BuOOH (400  $\mu$ M), en présence de  $Ca^{2+}$  (100  $\mu$ M) et du succinate (10 mM). Le temps pour obtenir  $V_{max}$  a été évalué sur une période de 15 minutes après une exposition d'oxydant exogène. A: représente la courbe d'absorbance ; contrôle SSM, (ligne pleine noire), SSM diabétique (ligne discontinue noire), SSM contrôle + CsA (ligne pleine grise), diabétiques SSM + CsA (ligne discontinue grise). B: représente la courbe d'absorbance ; contrôle IFM, (ligne pleine noire), IFM diabétique (ligne discontinue noire), IFM contrôle + CsA (ligne pleine grise), diabétiques IFM + CsA (ligne discontinue grise). C : est le graphique qui résume toutes les expériences. C : Les valeurs sont exprimées par la moyenne  $\pm$  SE;  $n = 6$  pour chaque groupe. \* : Significativement différent entre le groupe diabétique et contrôle ( $p < 0,05$ ). Mitochondrie sous-sarcolemmale (SSM) et interfibrillaire (IFM). Adapté de Williamson CL et al. 2010.

Par ailleurs, au cours d'études préliminaires réalisées dans notre laboratoire, nous avons induit un infarctus de taille moyenne chez des rats et réalisé des études sur mitochondries isolées six semaines après la chirurgie, à un moment où les fonctions hémodynamiques étaient normales. Les résultats que nous avons obtenus démontrent que, tout comme dans les cœurs d'animaux ACF, les mitochondries provenant des cœurs infarctés étaient plus vulnérables à l'ouverture du PTP induite par le  $\text{Ca}^{2+}$ , mais ne présentaient pas d'anomalies respiratoires. Cette observation est importante dans la mesure où il est bien reconnu que ce modèle entraîne, à plus long terme, l'apparition des dysfonctions mitochondriales au plan de l'enzymologie de la chaîne de transport des électrons, de la fonction respiratoire, de l'intégrité de l'ADNmt et de la morphologie mitochondriale [116, 229-231]. L'utilisation de ce modèle dans des études ultérieures pourrait donc s'avérer prometteuse, d'autant plus que le remodelage post-infarctus constitue une cause fréquente d'insuffisance cardiaque chez l'Homme.

Par ailleurs, les travaux réalisés chez la souris *mdx* dans les études deux à quatre nous ont permis de démontrer la présence d'une vulnérabilité mitochondriale précoce à l'ouverture du PTP dans le cœur déficient en dystrophine. Aucune données ne permettent actuellement de déterminer si cette vulnérabilité favorise l'apparition de dysfonctions mitochondriales plus sévères lorsque la cardiopathie se développe. Néanmoins, les résultats disponibles dans le muscle squelettique [225], qui est atteint beaucoup plus tôt que le cœur, le suggèrent fortement. Dans l'ensemble, il existe donc un faisceau suggérant que la vulnérabilité mitochondriale est un phénomène d'une part précoce et, d'autre part, commun à plusieurs cardiopathies d'étiologies diverses. Bien que d'autres travaux soient requis pour le



confirmer, ce mécanisme pourrait initier un cercle vicieux de dysfonctions croissantes et ainsi contribuer à la décompensation cardiaque.

## **6.2 Mécanismes impliqués dans la vulnérabilité à l'ouverture du PTP dans la cardiopathie dystrophique**

Par ailleurs, les études que nous avons réalisées sur le cœur de souris *mdx* nous ont permis de mettre en évidence deux facteurs qui pourraient expliquer la vulnérabilité des mitochondries à l'ouverture du PTP, lorsque le cœur dystrophique est exposé au stress, soit **a)** l'entrée excessive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cardiomyocytes et **b)** l'augmentation de la vitesse de prise calcique par les mitochondries. De plus, tel que discuté plus bas, les résultats obtenus avec le sildénafil et le SS-31 suggèrent également des pistes mécanistiques qu'il conviendrait d'investiguer plus en détail lors d'études futures.

### **6.2.1 Entrée excessive de calcium dans les cardiomyocytes**

Tel que présenté dans la revue de littérature (section 4.3.1), l'absence de dystrophine entraîne une activation aberrante de plusieurs canaux calciques incluant les canaux SACs [174, 175], et SOC, qui comprennent la famille des canaux TRPC [176-178], ainsi que les récepteurs à la ryanodine [179]. Ce phénomène a principalement été démontré *in vitro* sur des cardiomyocytes isolés exposés à un stress mécanique (stress hypo-osmotique) [6, 9]. Cependant, il est clair que ce phénomène a certainement joué un rôle dans nos études. En effet, nos résultats ont démontré que la norépinephrine en continu durant la perfusion augmentait de manière significative la pression développée et les fréquences cardiaques tant chez les cœurs contrôles que les cœurs *mdx*. De plus, comme l'ischémie-reperfusion en soit engendre une surcharge calcique, même chez le cœur normal [232], il est probable que cet effet se soit ajouté à celui du stress mécanique dans le cœur *mdx*, ce

qui expliquerait l'augmentation du contenu tissulaire total en  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cœurs *mdx* vs le cœurs normaux (étude 3).

Nos données ont également démontré que l'administration de sildénafil chez la souris *mdx* a permis de réduire la surcharge calcique observée à la suite de l'I-R (étude 3). Cette observation est intéressante puisqu'il est bien documenté chez la souris *mdx* que le cœur et les muscles squelettiques présentent un déficit de signalisation cGMP-PKG [7, 169], la principale voie de signalisation à être stimulée par le sildénafil. Il est donc possible qu'outre le stress mécanique *per se*, le déficit de la voie cGMP-PKG participe à l'accroissement des entrées calciques dans le cœur *mdx*. Cependant, comme la voie cGMP-PKG module l'activité et l'expression de plusieurs canaux calciques [213], il est impossible à l'heure actuelle de déterminer l'identité des canaux qui pourraient être impliqués. Un candidat potentiel pourrait être les canaux TRPC1. En effet, l'expression de ces canaux est augmentée dans les cardiomyocytes déficients en dystrophine, ce qui contribue directement à l'accroissement des entrées calciques en réponse au stress mécanique [175]. De plus, des résultats récents ont démontré que les canaux TRPC1 étaient inhibés par la signalisation cGMP/PKG dans les cellules musculaires lisses [215]. Cependant, la capacité du sildénafil à inhiber ces canaux dans les cardiomyocytes de souris *mdx* n'a jamais été évaluée. Des études d'électrophysiologie cellulaire seraient requises pour évaluer directement cette hypothèse.

### 6.2.2 Vitesse de prise calcique mitochondriale

Dans l'étude 3 de la thèse, nous avons observé que la vitesse de prise calcique mitochondriale mesurée sur des fibres perméabilisées de cœurs frais (non soumis à l'I-R) était supérieure chez les souris *mdx* que chez les souris contrôles, ce

qui, à notre connaissance, n'a jamais été rapporté auparavant. De façon théorique, les facteurs qui peuvent influencer la prise de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les conditions expérimentales utilisées sont nombreux et incluent *a)* le potentiel de membrane mitochondrial et tout facteur l'affectant, *b)* les propriétés cinétiques des transporteurs calciques principalement de l'uniporteur et *c)* la concentration effective de  $\text{Ca}^{2+}$  à proximité de ces transporteurs qui peut-être affectée par des modifications de l'architecture intracellulaire [233]. *À priori*, puisque dans nos études l'administration aiguë de sildénafil a permis de normaliser la vitesse de transport  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial chez les souris *mdx*, il nous apparaît peu probable que cela soit relié à une modification de l'architecture cellulaire. Par ailleurs, nous n'avons décelé aucune anomalie respiratoire dans les mitochondries de coeurs *mdx* qui puisse nous indiquer un déficit au niveau de la capacité à générer le potentiel de membrane. Une hypothèse serait donc que la régulation cinétique de l'uniporteur calcique est modifiée dans les cardiomyocytes *mdx*, possiblement à titre de mécanisme pour corriger la cinétique du  $\text{Ca}^{2+}$  libre cytosolique. À cet égard, le groupe de Spät a démontré que la machinerie de transport du calcium dans les mitochondries était régulé par la MAPK p38, ainsi que par plusieurs isoformes de PKC [234, 235]. Il serait donc intéressant de déterminer si PKG possède la capacité de phosphoryler l'uniporteur calcique pour en diminuer son activité. Si tel est le cas, l'augmentation de la vitesse de prise calcique que nous avons observée dans le coeur *mdx* pourrait s'expliquer par le déficit de signalisation NO-cGMP chez ces animaux.

### 6.2.3 Stress oxydant mitochondrial

Tel que présenté dans la revue de littérature (section 4.3.2), plusieurs études ont démontré la présence de stress oxydant dans le coeur de jeunes souris *mdx* [6, 7], et ce, bien avant le développement de la cardiopathie. Dans l'étude 3 de la thèse,

ainsi que dans les études antérieures du groupe de Christine Des Rosiers [7], une baisse significative de l'activité de l'aconitase a été relevée dans le cœur *mdx*, comparativement au cœur contrôle, suggérant fortement une implication des mitochondries dans ce phénomène. Par ailleurs, le groupe de Niggli a démontré une production accrue de superoxyde mitochondrial dans des cardiomyocytes isolés de cœurs *mdx* [6]. Ces auteurs avaient démontré que ce phénomène était visible à l'état basal mais était fortement exacerbé en réponse à l'application d'un stress mécanique. Cependant, dans cette étude, aucune mesure n'a été effectuée sur des mitochondries isolées, ce qui n'a pas permis de déterminer si l'environnement cellulaire ou si des dysfonctions mitochondriales intrinsèques sont impliqués dans l'accroissement de la production de ROS.

Dans l'étude 3 de cette thèse, nous avons démontré que la relâche nette de  $H_2O_2$ , ainsi que la capacité d'élimination du  $H_2O_2$  mesurée *in vitro* sur des fibres perméabilisées provenant de cœurs fraîchement isolés étaient similaires chez les souris *mdx* et les souris contrôles. Ces données nouvelles suggèrent donc que la capacité de la chaîne respiratoire à produire du superoxyde, ainsi que celle des divers systèmes anti-oxydants, ne sont pas modifiées dans le cœur déficient en dystrophine, du moins pas de manière précoce. Nos données suggèrent donc que des variations au niveau de facteurs cellulaires (tel que l'augmentation du  $Ca^{2+}$ ), plutôt que des modifications de la capacité de production et d'élimination des ROS, sont responsables du stress oxydant mitochondrial.

Compte tenu de la présence de stress oxydant mitochondrial dans le cœur *mdx* nous avons, dans l'étude 4 de cette thèse, testé l'impact d'un anti-oxydant ciblé aux mitochondries sur la réponse cardiaque au stress. Malheureusement, bien que nous

ayons démontré à l'aide de mesures sur des fibres cardiaques perméabilisées que le SS-31 administré *in vivo* à une dose utilisée auparavant [236] atteignait rapidement les mitochondries et diminuait la relâche de  $H_2O_2$ , nous n'avons observé aucun effet bénéfique sur le cœur *mdx* lorsque soumis à une I-R en terme de récupération de la fonction contractile, de dommage tissulaire et d'ouverture du PTP. Ces résultats sont *à priori* surprenants puisque des études antérieures réalisées sur le cœur normal ont démontré un effet protecteur du SS-31 contre le dommage ischémique [237]. De plus, une étude récente réalisée par Buyse et al. [238] a démontré que chez la souris *mdx* un traitement prolongé (de l'âge de 4 sem jusqu'à 10 mois), avec l'analogue du coenzyme Q10 idébénone, permettait notamment de réduire l'inflammation cardiaque, ainsi que la dysfonction systolique et la mortalité induite par un stress hémodynamique à la dobutamine *in vivo*.

Les seules explications plausibles que nous ayons en ce moment sont que, dans le cœur *mdx*, la dose unique de SS-31 que nous avons administrée s'est avérée insuffisante pour conférer une protection contre le stress relativement sévère (I-R en présence de noradrénaline) que nous avons utilisé. Il n'est pas exclu qu'un traitement chronique avec le SS-31 s'avère autant sinon plus efficace que l'idébénone, qui n'est pas ciblé de manière aussi efficace aux mitochondries, pour prévenir la dysfonction cardiaque *in vivo* tel que mesuré par Buyse et al. [238]. Ceci étant dit, nos résultats suggèrent tout de même que le tamponnement des radicaux libres dans les mitochondries est probablement moins efficace pour prévenir la dysfonction mitochondriale que la correction de l'homéostasie calcique, tel que le sildénafil a permis de le faire.

## 7 BIBLIOGRAPHIE

1. Marcil, M., et al., *Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress*. J Mol Cell Cardiol, 2006.
2. Bowsher, C.G. and A.K. Tobin, *Compartmentation of metabolism within mitochondria and plastids*. J Exp Bot, 2001. **52**(356): p. 513-27.
3. Mackenzie, S. and L. McIntosh, *Higher plant mitochondria*. Plant Cell, 1999. **11**(4): p. 571-86.
4. Marin-Garcia, J., Y. Pi, and M.J. Goldenthal, *Mitochondrial-nuclear cross-talk in the aging and failing heart*. Cardiovasc Drugs Ther, 2006. **20**(6): p. 477-91.
5. Charron, P. and M. Komajda, *Are we ready for pharmacogenomics in heart failure?* Eur J Pharmacol, 2001. **417**(1-2): p. 1-9.
6. Jung, C., et al., *Dystrophic cardiomyopathy: amplification of cellular damage by Ca<sup>2+</sup> signalling and reactive oxygen species-generating pathways*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(4): p. 766-73.
7. Khairallah, M., et al., *Metabolic and signaling alterations in dystrophin-deficient hearts precede overt cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(2): p. 119-29.
8. Shkryl, V.M., et al., *Reciprocal amplification of ROS and Ca(2+) signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers*. Pflugers Arch, 2009. **458**(5): p. 915-28.
9. Fanchaouy, M., et al., *Pathways of abnormal stress-induced Ca<sup>2+</sup> influx into dystrophic mdx cardiomyocytes*. Cell Calcium, 2009. **46**(2): p. 114-21.
10. Danialou, G., et al., *Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury*. FASEB J, 2001. **15**(9): p. 1655-7.
11. Kantor, P.F., J.R. Dyck, and G.D. Lopaschuk, *Fatty acid oxidation in the reperfused ischemic heart*. Am J Med Sci, 1999. **318**(1): p. 3-14.
12. Sambandam, N., et al., *Energy metabolism in the hypertrophied heart*. Heart Fail Rev, 2002. **7**(2): p. 161-73.
13. van der Klei, I.J., M. Veenhuis, and W. Neupert, *A morphological view on mitochondrial protein targeting*. Microsc Res Tech, 1994. **27**(4): p. 284-93.
14. Rapizzi, E., et al., *Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca<sup>2+</sup> microdomains to mitochondria*. J Cell Biol, 2002. **159**(4): p. 613-24.
15. Gincel, D., H. Zaid, and V. Shoshan-Barmatz, *Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 147-55.
16. Chen, Q., et al., *Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36027-31.
17. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
18. Skalka, M., J. Matyasova, and M. Cejkova, *Dna in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments*. FEBS Lett, 1976. **72**(2): p. 271-4.
19. Wyllie, A.H., *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*. Nature, 1980. **284**(5756): p. 555-6.
20. Wyllie, A.H., et al., *Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis*. J Pathol, 1984. **142**(1): p. 67-77.

21. Castedo, M., et al., *Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis*. J Immunol, 1996. **157**(2): p. 512-21.
22. Martin, S.J., et al., *Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28753-6.
23. Martin, S.J., et al., *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1545-56.
24. Fadok, V.A., et al., *The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes*. Cell Death Differ, 1998. **5**(7): p. 551-62.
25. Fadok, V.A., et al., *CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3)*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6250-7.
26. Rathmell, J.C. and C.B. Thompson, *The central effectors of cell death in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 781-828.
27. Vaux, D.L. and A. Strasser, *The molecular biology of apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2239-44.
28. Shi, Y., *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 459-70.
29. Clerk, A., et al., *Regulation of cardiac myocyte cell death*. Pharmacol Ther, 2003. **97**(3): p. 223-61.
30. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 1997. **326** ( Pt 1): p. 1-16.
31. Grutter, M.G., *Caspases: key players in programmed cell death*. Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(6): p. 649-55.
32. Marshman, E., et al., *Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine*. J Pathol, 2001. **195**(3): p. 285-92.
33. Roth, K.A., *Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(9): p. 829-38.
34. Coleman, M.L., et al., *Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 339-45.
35. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
36. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
37. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell, 1996. **86**(1): p. 147-57.
38. Nagata, S., *Apoptotic DNA fragmentation*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 12-8.
39. Debatin, K.M. and P.H. Krammer, *Death receptors in chemotherapy and cancer*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2950-66.
40. Opferman, J.T. and S.J. Korsmeyer, *Apoptosis in the development and maintenance of the immune system*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 410-5.
41. Elsasser, A., K. Suzuki, and J. Schaper, *Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(5): p. 711-24.
42. Gill, C., R. Mestrlil, and A. Samali, *Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target?* Faseb J, 2002. **16**(2): p. 135-46.

43. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
44. Mayer, B. and R. Oberbauer, *Mitochondrial regulation of apoptosis*. News Physiol Sci, 2003. **18**: p. 89-94.
45. Miramar, M.D., et al., *NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16391-8.
46. Hengartner, M.O., *Apoptosis. DNA destroyers*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 27, 29.
47. Adrain, C., E.M. Creagh, and S.J. Martin, *Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2*. Embo J, 2001. **20**(23): p. 6627-36.
48. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 647-56.
49. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
50. Burlacu, A., *Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins*. J Cell Mol Med, 2003. **7**(3): p. 249-57.
51. Griffiths, G.J., et al., *Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis*. J Cell Biol, 1999. **144**(5): p. 903-14.
52. Haworth, R.A. and D.R. Hunter, *The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 460-7.
53. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 453-9.
54. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca<sup>2+</sup> release*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 468-77.
55. Zoratti, M. and I. Szabo, *The mitochondrial permeability transition*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**(2): p. 139-76.
56. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. Biochem J, 1999. **341** ( Pt 2): p. 233-49.
57. Suleiman, M.S., A.P. Halestrap, and E.J. Griffiths, *Mitochondria: a target for myocardial protection*. Pharmacol Ther, 2001. **89**(1): p. 29-46.
58. Crompton, M., *Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death*. J Physiol, 2000. **529** Pt 1: p. 11-21.
59. Crompton, M., et al., *The mitochondrial permeability transition pore*. Biochem Soc Symp, 1999. **66**: p. 167-79.
60. Zoratti, M., I. Szabo, and U. De Marchi, *Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house?* Biochim Biophys Acta, 2005. **1706**(1-2): p. 40-52.
61. Azzi, A. and G.F. Azzzone, *Swelling and shrinkage phenomena in liver mitochondria. III. Irreversible swelling induced by inorganic phosphate and Ca<sup>2+</sup>*. Biochim Biophys Acta, 1966. **113**(3): p. 438-44.
62. Bernardi, P., et al., *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations*. J Biol Chem, 1992. **267**(5): p. 2934-9.
63. Szabo, I., P. Bernardi, and M. Zoratti, *Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons*. J Biol Chem, 1992. **267**(5): p. 2940-6.



64. Gulbins, E., S. Dreschers, and J. Bock, *Role of mitochondria in apoptosis*. Exp Physiol, 2003. **88**(1): p. 85-90.
65. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death*. Apoptosis, 2006.
66. Crompton, M., H. Ellinger, and A. Costi, *Inhibition by cyclosporin A of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress*. Biochem J, 1988. **255**(1): p. 357-60.
67. Halestrap, A.P. and A.M. Davidson, *Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase*. Biochem J, 1990. **268**(1): p. 153-60.
68. Duchen, M.R., et al., *On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(10): p. 1790-4.
69. Crompton, M. and L. Andreeva, *On the involvement of a mitochondrial pore in reperfusion injury*. Basic Res Cardiol, 1993. **88**(5): p. 513-23.
70. Crompton, M. and A. Costi, *A heart mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states*. Biochem J, 1990. **266**(1): p. 33-9.
71. Broekemeier, K.M. and D.R. Pfeiffer, *Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases*. Biochemistry, 1995. **34**(50): p. 16440-9.
72. Baines, C.P., et al., *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 658-62.
73. Bernardi, P., et al., *The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target*. Febs J, 2006. **273**(10): p. 2077-99.
74. Schultheiss, H.P. and M. Klingenberg, *Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator. Organ specificity and conformation specificity*. Eur J Biochem, 1984. **143**(3): p. 599-605.
75. Kokoszka, J.E., et al., *The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore*. Nature, 2004. **427**(6973): p. 461-5.
76. Baines, C.P., et al., *Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death*. Nat Cell Biol, 2007.
77. Basso, E., et al., *Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18558-61.
78. Schinzel, A.C., et al., *Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12005-10.
79. Nakagawa, T., et al., *Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 652-8.
80. Leung, A.W., P. Varanyuwatana, and A.P. Halestrap, *The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26312-23.

81. Halestrap, A.P. and P. Pasdois, *The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(11): p. 1402-15.
82. Basso, E., et al., *Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26307-11.
83. Alcalá, S., et al., *A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release*. Oncogene, 2008. **27**(1): p. 44-54.
84. Halestrap, A.P., *A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(4): p. 841-60.
85. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(12): p. 1461-9.
86. Hausenloy, D.J., et al., *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 534-43.
87. Borutaite, V., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 357-66.
88. Di Lisa, F., et al., *Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2571-5.
89. Ruiz, F., et al., *Cyclosporin A targets involved in protection against glutamate excitotoxicity*. Eur J Pharmacol, 2000. **404**(1-2): p. 29-39.
90. Waldmeier, P.C., et al., *Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(1): p. 22-9.
91. Clarke, S.J., G.P. McStay, and A.P. Halestrap, *Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 34793-9.
92. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochem J, 1995. **307** ( Pt 1): p. 93-8.
93. Berenji, K., et al., *Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(1): p. H8-H16.
94. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 45-79.
95. Katz, A.M., *Maladaptive growth in the failing heart: the cardiomyopathy of overload*. Cardiovasc Drugs Ther, 2002. **16**(3): p. 245-9.
96. Benjamin, E.J. and D. Levy, *Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality?* Am J Med Sci, 1999. **317**(3): p. 168-75.
97. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
98. 2009 Suivi des maladies du cœur et des accidents vasculaires cérébraux au Canada. Publié en juin 2009. Référence provenant du site internet de la Fondation des Maladies du Cœur du Canada

99. Kostuk, W.J., *Congestive heart failure: what can we offer our patients?* Cmaj, 2001. **165**(8): p. 1053-5.
100. A.M.A., *2002 Heart and Stroke Statistical Update*. Dallas, TX: American Heart Association. 2001.
101. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 500-8.
102. Tsutsui, H., *Mitochondrial oxidative stress and heart failure*. Intern Med, 2006. **45**(13): p. 809-13.
103. Li, Y.Y., et al., *Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity*. Circulation, 2001. **104**(20): p. 2492-7.
104. Marin-Garcia, J. and M.J. Goldenthal, *Understanding the impact of mitochondrial defects in cardiovascular disease: a review*. J Card Fail, 2002. **8**(5): p. 347-61.
105. Ozcan, C., et al., *Mitochondrial tolerance to stress impaired in failing heart*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(9): p. 1161-6.
106. Sharov, V.G., et al., *Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(12): p. 2361-7.
107. Stanley, W.C. and C.L. Hoppel, *Mitochondrial dysfunction in heart failure: potential for therapeutic interventions?* Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 805-6.
108. Kang, P.M., et al., *Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(1): p. H72-80.
109. Sabbah, H.N., V.G. Sharov, and S. Goldstein, *Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure*. Heart Fail Rev, 2000. **5**(2): p. 131-8.
110. Buchwald, A., et al., *Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy*. Eur Heart J, 1990. **11**(6): p. 509-16.
111. Ide, T., et al., *Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium*. Circ Res, 1999. **85**(4): p. 357-63.
112. Jarreta, D., et al., *Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 860-5.
113. Javadov, S., et al., *NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(1): p. 135-43.
114. Moe, G.W., et al., *In vivo TNF-alpha inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(4): p. H1813-20.
115. Scheubel, R.J., et al., *Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(12): p. 2174-81.
116. Ide, T., et al., *Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction*. Circ Res, 2001. **88**(5): p. 529-35.
117. Sordahl, L.A., et al., *Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure*. Am J Physiol, 1973. **224**(3): p. 497-502.
118. Guarnieri, C., C. Muscari, and C.M. Caldarella, *Oxygen radicals and tissue damage in heart hypertrophy*. Adv Myocardiol, 1985. **5**: p. 191-9.
119. Kobayashi, A., et al., *Effects of verapamil on experimental cardiomyopathy in the Bio 14.6 Syrian hamster*. J Am Coll Cardiol, 1987. **10**(5): p. 1128-38.

120. Li, Y.Y., et al., *Point mutations in mitochondrial DNA of patients with dilated cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(10): p. 2699-709.
121. Marin-Garcia, J., et al., *Is age a contributory factor of mitochondrial bioenergetic decline and DNA defects in idiopathic dilated cardiomyopathy?* Cardiovasc Pathol, 1999. **8**(4): p. 217-22.
122. Marin-Garcia, J., et al., *A point mutation in the cytb gene of cardiac mtDNA associated with complex III deficiency in ischemic cardiomyopathy*. Biochem Mol Biol Int, 1996. **40**(3): p. 487-95.
123. Dhalla, A.K., M.F. Hill, and P.K. Singal, *Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1996. **28**(2): p. 506-14.
124. Hill, M.F. and P.K. Singal, *Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 291-300.
125. Hill, M.F. and P.K. Singal, *Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction*. Circulation, 1997. **96**(7): p. 2414-20.
126. Swynghedauw, B. and C. Delcayre, *Biology of cardiac overload*. Pathobiol Annu, 1982. **12**: p. 137-83.
127. Dart, C.H., Jr. and J.O. Holloszy, *Hypertrophied non-failing rat heart; partial biochemical characterization*. Circ Res, 1969. **25**(3): p. 245-53.
128. Leichtweis, S.B., et al., *Ischaemia-reperfusion induced alterations of mitochondrial function in hypertrophied rat heart*. Acta Physiol Scand, 1996. **156**(1): p. 51-60.
129. Lindenmayer, G.E., L.A. Sordahl, and A. Schwartz, *Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure*. Circ Res, 1968. **23**(3): p. 439-50.
130. Stoner, C.D., M.M. Ressallat, and H.D. Sirak, *Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from chronically stressed dog hearts*. Circ Res, 1968. **23**(1): p. 87-97.
131. Brookes, P.S., et al., *Increased sensitivity of mitochondrial respiration to inhibition by nitric oxide in cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(1): p. 69-82.
132. Cleeter, M.W., et al., *Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases*. FEBS Lett, 1994. **345**(1): p. 50-4.
133. Mazat, J.P., et al., *Metabolic control analysis and threshold effect in oxidative phosphorylation: implications for mitochondrial pathologies*. Mol Cell Biochem, 1997. **174**(1-2): p. 143-8.
134. Thoenes, M., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase in failing and non-failing human heart*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(1): p. 165-9.
135. Anderson, P.G., Viera, L., Ye, YZ., Beckman, J.S., *Increased peroxynitrite during ischemia and reperfusion in hypertrophied rat hearts*. J Mol Cell Cardiol 1998. **30**: p. A236.
136. Hein, S., et al., *Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms*. Circulation, 2003. **107**(7): p. 984-91.
137. Kostin, S., et al., *Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts*. Circ Res, 2003. **92**(7): p. 715-24.
138. Moe, G.W., et al., *Early and persistent activation of myocardial apoptosis, bax and caspases: insights into mechanisms of progression of heart failure*. Pathophysiology, 2002. **8**(3): p. 183-192.

139. Narula, J., et al., *Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8144-9.
140. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
141. Scheubel, R.J., et al., *Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: fragile balance of myocyte survival?* J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(3): p. 481-8.
142. Saraste, A., et al., *Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation*. Eur J Clin Invest, 1999. **29**(5): p. 380-6.
143. Allard, M.F., et al., *Calcium overload during reperfusion is accelerated in isolated hypertrophied rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(12): p. 1551-63.
144. Anderson, P.G., et al., *Increased ischemic injury but decreased hypoxic injury in hypertrophied rat hearts*. Circ Res, 1990. **67**(4): p. 948-59.
145. Gaasch, W.H., et al., *Tolerance of the hypertrophic heart to ischemia. Studies in compensated and failing dog hearts with pressure overload hypertrophy*. Circulation, 1990. **81**(5): p. 1644-53.
146. Di Lisa, F., *Mitochondrial contribution in the progression of cardiac ischemic injury*. IUBMB Life, 2001. **52**(3-5): p. 255-61.
147. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and S.A. Javadov, *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 372-85.
148. Chauvin, C., et al., *Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 41394-8.
149. Detaille, D., et al., *Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2179-87.
150. Long, X., et al., *Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> flux and respiratory enzyme activity decline are early events in cardiomyocyte response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(1): p. 63-70.
151. Nieminen, A.L., et al., *Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide*. Biochem J, 1995. **307** ( Pt 1): p. 99-106.
152. Souzeau, E., et al., *A genetic locus accentuates the effect of volume overload on adverse left ventricular remodeling in male and female rats*. Hypertension, 2006. **47**(1): p. 128-33.
153. Matas, J., et al., *Increased expression and intramitochondrial translocation of cyclophilin-D associates with increased vulnerability of the permeability transition pore to stress-induced opening during compensated ventricular hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(3): p. 420-30.
154. Chien, K.R., *Stress pathways and heart failure*. Cell, 1999. **98**(5): p. 555-8.
155. Li, J.M., et al., *Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure*. Hypertension, 2002. **40**(4): p. 477-84.
156. Balke, C.W. and S.R. Shorofsky, *Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(2): p. 290-9.
157. Yano, M., Y. Ikeda, and M. Matsuzaki, *Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 556-64.
158. Finsterer, J. and C. Stollberger, *The heart in human dystrophinopathies*. Cardiology, 2003. **99**(1): p. 1-19.

159. Whitehead, N.P., E.W. Yeung, and D.G. Allen, *Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(7): p. 657-62.
160. Quinlan, J.G., et al., *Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings*. Neuromuscul Disord, 2004. **14**(8-9): p. 491-6.
161. Bia, B.L., et al., *Decreased myocardial nNOS, increased iNOS and abnormal ECGs in mouse models of Duchenne muscular dystrophy*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(10): p. 1857-62.
162. Wilding, J.R., et al., *Dystrophin- and MLP-deficient mouse hearts: marked differences in morphology and function, but similar accumulation of cytoskeletal proteins*. FASEB J, 2005. **19**(1): p. 79-81.
163. Weller, B., G. Karpati, and S. Carpenter, *Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions*. J Neurol Sci, 1990. **100**(1-2): p. 9-13.
164. Clarke, M.S., R. Khakee, and P.L. McNeil, *Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle*. J Cell Sci, 1993. **106** ( Pt 1): p. 121-33.
165. Vilquin, J.T., et al., *Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise*. Muscle Nerve, 1998. **21**(5): p. 567-76.
166. Brussee, V., F. Tardif, and J.P. Tremblay, *Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice*. Neuromuscul Disord, 1997. **7**(8): p. 487-92.
167. Nakamura, A., et al., *Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice*. FEBS Lett, 2002. **520**(1-3): p. 18-24.
168. Kamogawa, Y., et al., *Dystrophin-deficient myocardium is vulnerable to pressure overload in vivo*. Cardiovasc Res, 2001. **50**(3): p. 509-15.
169. Khairallah, M., et al., *Sildenafil and cardiomyocyte-specific cGMP signaling prevent cardiomyopathic changes associated with dystrophin deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(19): p. 7028-33.
170. Li, W., et al., *Early manifestation of alteration in cardiac function in dystrophin deficient mdx mouse using 3D CMR tagging*. J Cardiovasc Magn Reson, 2009. **11**: p. 40.
171. Yeung, E.W., et al., *Effects of stretch-activated channel blockers on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and muscle damage in the mdx mouse*. J Physiol, 2005. **562**(Pt 2): p. 367-80.
172. Bodensteiner, J.B. and A.G. Engel, *Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies*. Neurology, 1978. **28**(5): p. 439-46.
173. Yasuda, S., et al., *Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 1025-9.
174. Gailly, P., *New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1600**(1-2): p. 38-44.
175. Williams, I.A. and D.G. Allen, *Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(2): p. H846-55.
176. Huang, J., et al., *Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry modulates sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> loading in neonatal rabbit cardiac ventricular myocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(6): p. C1572-82.
177. Robert, V., et al., *Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4647-51.

178. Vandebrouck, A., et al., *Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes*. FASEB J, 2006. **20**(1): p. 136-8.
179. Bellinger, A.M., et al., *Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 325-30.
180. Millay, D.P., et al., *Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(45): p. 19023-8.
181. Doran, P., et al., *Subproteomics analysis of Ca<sup>+</sup>-binding proteins demonstrates decreased calsequestrin expression in dystrophic mouse skeletal muscle*. Eur J Biochem, 2004. **271**(19): p. 3943-52.
182. Dowling, P., P. Doran, and K. Ohlendieck, *Drastic reduction of sarcalumenin in Dp427 (dystrophin of 427 kDa)-deficient fibres indicates that abnormal calcium handling plays a key role in muscular dystrophy*. Biochem J, 2004. **379**(Pt 2): p. 479-88.
183. Rizzuto, R., et al., *Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria*. Science, 1993. **262**(5134): p. 744-7.
184. Robert, V., et al., *Beat-to-beat oscillations of mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] in cardiac cells*. EMBO J, 2001. **20**(17): p. 4998-5007.
185. Gilibert, J.A. and A.B. Parekh, *Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC)*. EMBO J, 2000. **19**(23): p. 6401-7.
186. Batandier, C., X. Leverve, and E. Fontaine, *Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17197-204.
187. Wang, W., et al., *Superoxide flashes in single mitochondria*. Cell, 2008. **134**(2): p. 279-90.
188. Millay, D.P., et al., *Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy*. Nat Med, 2008. **14**(4): p. 442-7.
189. Wissing, E.R., et al., *Debio-025 is more effective than prednisone in reducing muscular pathology in mdx mice*. Neuromuscul Disord, 2010. **20**(11): p. 753-60.
190. Turner, P.R., et al., *Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice*. Nature, 1988. **335**(6192): p. 735-8.
191. Goll, D.E., et al., *The calpain system*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 731-801.
192. Zaidi, S.I. and H.T. Narahara, *Degradation of skeletal muscle plasma membrane proteins by calpain*. J Membr Biol, 1989. **110**(3): p. 209-16.
193. Bonucci, G., et al., *Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins*. Am J Pathol, 2003. **163**(4): p. 1663-75.
194. Badalamente, M.A. and A. Stracher, *Delay of muscle degeneration and necrosis in mdx mice by calpain inhibition*. Muscle Nerve, 2000. **23**(1): p. 106-11.
195. Spencer, M.J. and R.L. Mellgren, *Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(21): p. 2645-55.
196. Kar, P., et al., *Mitochondrial calpain system: An overview*. Arch Biochem Biophys, 2010. **495**(1): p. 1-7.

197. Williams, I.A. and D.G. Allen, *The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(3): p. H1969-77.
198. Smith, R.A. and M.P. Murphy, *Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1201**: p. 96-103.
199. Szeto, H.H., *Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants*. AAPS J, 2006. **8**(2): p. E277-83.
200. Campbell, K.P. and S.D. Kahl, *Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 259-62.
201. Hillier, B.J., et al., *Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex*. Science, 1999. **284**(5415): p. 812-5.
202. Tochio, H., et al., *Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(5): p. 417-21.
203. Wehling, M., M.J. Spencer, and J.G. Tidball, *A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice*. J Cell Biol, 2001. **155**(1): p. 123-31.
204. Brenman, J.E., et al., *Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy*. Cell, 1995. **82**(5): p. 743-52.
205. Chang, W.J., et al., *Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9142-7.
206. Wehling-Henricks, M., et al., *Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(14): p. 1921-33.
207. Thomas, G.D., et al., *Impaired metabolic modulation of alpha-adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 15090-5.
208. Bhattacharya, S.K., P.L. Johnson, and J.H. Thakar, *Reversal of impaired oxidative phosphorylation and calcium overloading in the in vitro cardiac mitochondria of CHF-146 dystrophic hamsters with hereditary muscular dystrophy*. J Neurol Sci, 1993. **120**(2): p. 180-6.
209. Bhattacharya, S.K., et al., *Reduced sarcolemmal dystrophin distribution and upregulation of utrophin in the cardiac and skeletal muscles of CHF-146 dystrophic hamsters*. Mol Chem Neuropathol, 1997. **31**(2): p. 187-206.
210. Mendell, J.R., W.K. Engel, and E.C. Derrer, *Duchenne muscular dystrophy: functional ischemia reproduces its characteristic lesions*. Science, 1971. **172**(988): p. 1143-5.
211. Sander, M., et al., *Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13818-23.
212. Gneccchi-Ruscone, T., et al., *Cardiomyopathy in duchenne, becker, and sarcoglycanopathies: a role for coronary dysfunction?* Muscle Nerve, 1999. **22**(11): p. 1549-56.
213. Mendelsohn, M.E., *Viagra: now mending hearts*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 115-6.
214. Schlossmann, J., R. Feil, and F. Hofmann, *Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases*. Ann Med, 2003. **35**(1): p. 21-7.
215. Chen, J., et al., *Inhibition of TRPC1/TRPC3 by PKG contributes to NO-mediated vasorelaxation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(1): p. H417-24.



216. Ockaili, R., et al., *Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(3): p. H1263-9.
217. Salloum, F., et al., *Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart*. Circ Res, 2003. **92**(6): p. 595-7.
218. Hausenloy, D., et al., *Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection*. Circulation, 2004. **109**(14): p. 1714-7.
219. Hausenloy, D.J., et al., *Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H841-9.
220. Javadov, S.A., et al., *Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart*. J Physiol, 2003. **549**(Pt 2): p. 513-24.
221. Fisher, P.W., et al., *Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity*. Circulation, 2005. **111**(13): p. 1601-10.
222. Salloum, F.N., et al., *Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(2): p. 453-8.
223. Costa, A.D., et al., *Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria*. Circ Res, 2005. **97**(4): p. 329-36.
224. Costa, A.D., et al., *The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 20801-8.
225. Kuznetsov, A.V., et al., *Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse*. Mol Cell Biochem, 1998. **183**(1-2): p. 87-96.
226. Jongpiputvanich, S., T. Sueblinvong, and T. Norapucsunton, *Mitochondrial respiratory chain dysfunction in various neuromuscular diseases*. J Clin Neurosci, 2005. **12**(4): p. 426-8.
227. Rosca, M.G. and C.L. Hoppel, *Mitochondria in heart failure*. Cardiovasc Res, 2010. **88**(1): p. 40-50.
228. Williamson, C.L., et al., *Enhanced apoptotic propensity in diabetic cardiac mitochondria: influence of subcellular spatial location*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(2): p. H633-42.
229. Muscari, C., et al., *Changes in myocardial mitochondrial respiration after ligation of the coronary artery in pigs*. Cardioscience, 1990. **1**(4): p. 261-4.
230. Hu, Q., et al., *Profound bioenergetic abnormalities in peri-infarct myocardial regions*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(2): p. H648-57.
231. McLachlan, C.S., et al., *Acute coronary ligation in the dog induces time-dependent transitional changes in mitochondrial crista in the non-ischaemic ventricular myocardium*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(3): p. 250-3.
232. Talukder, M.A., J.L. Zweier, and M. Periasamy, *Targeting calcium transport in ischaemic heart disease*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(3): p. 345-52.
233. Spat, A., et al., *High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling*. Cell Calcium, 2008. **44**(1): p. 51-63.
234. Koncz, P., et al., *Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake is inhibited by a concerted action of p38 MAPK and protein kinase D*. Cell Calcium, 2009. **46**(2): p. 122-9.

- 235. Szanda, G., et al., *Participation of p38 MAPK and a novel-type protein kinase C in the control of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake*. Cell Calcium, 2008. **43**(3): p. 250-9.
- 236. Cho, J., et al., *Potent mitochondria-targeted peptides reduce myocardial infarction in rats*. Coron Artery Dis, 2007. **18**(3): p. 215-20.
- 237. Szeto, H.H., *Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(3): p. 601-19.
- 238. Buyse, G.M., et al., *Long-term blinded placebo-controlled study of SNT-MC17/idebenone in the dystrophin deficient mdx mouse: cardiac protection and improved exercise performance*. Eur Heart J, 2009. **30**(1): p. 116-24.